

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**FUNCIONALIDAD DE LOS RELOJES BIOLÓGICOS EN EL
CARPÍN:
LA HORA DE LA ALIMENTACIÓN COMO SINCRONIZADOR Y
CARACTERIZACIÓN DE RITMOS DE SALIDA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Laura Gabriela Nisembaum

Directoras

María Jesús Delgado Saavedra
Esther Isorna Alonso

Madrid, 2014

TESIS DOCTORAL

**FUNCIONALIDAD DE LOS RELOJES BIOLÓGICOS EN EL CARPÍN: LA
HORA DE LA ALIMENTACIÓN COMO SINCRONIZADOR Y
CARACTERIZACIÓN DE RITMOS DE SALIDA.**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

LAURA GABRIELA NISEMBAUM
Año 2013

María Jesús Delgado Saavedra, Catedrática de la Universidad Complutense de Madrid, y Esther Isorna Alonso, Profesora Ayudante Doctor de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “**Funcionalidad de los relojes biológicos en el carpín (*Carassius auratus*): La hora de la alimentación como sincronizador y caracterización de ritmos de salida.**” presentada por Laura Gabriela Nisembaum, licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para ser juzgada.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, firman el presente certificado a ____ de diciembre de 2013

Dra. María Jesús Delgado Saavedra

Dra. Esther Isorna Alonso

La presente tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) de la Facultad de CC. Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. María Jesús Delgado Saavedra y la codirección de la Dra. Esther Isorna Alonso.

Este trabajo se realizó con la ayuda económica del Ministerio de Economía y Competitividad del gobierno de España (AGL2010-22247-C03-02). Laura Gabriela Nisembaum fue dotada con una Beca predoctoral del Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación MAEC-AECID (convocatoria 2008).



A mis padres y a mi hermano.

ABREVIATURAS

- o **5HT** Serotonina (5-hidroxitriptamina)
- o **5MT** 5-Metoxitriptamina
- o **12L:12D** 12 horas de luz:12 horas de oscuridad.
- o **24D** 24 horas de oscuridad.
- o **24L** 24 horas de luz.
- o **Φ** Acrofase
- o **A** Amplitud
- o **AADC** Aminoácido aromático descarboxilasa
- o **AANAT** Arilalquilamina *N*-acetiltransferasa
- o **Ach** Acetilcolina
- o **ACoA** Acetil coenzima A
- o **AMPc** Adenosín monofosfato cíclico
- o **ANAT** Arilamina *N*-acetiltransferasa
- o **ARNm** Ácido ribonucleico mensajero
- o **bHLH-PAS** Hélice-lazo-hélice con dominio PAS
- o **Bmal1** gen *brain-muscle-arnt-like protein 1*.
- o **CCG** Gen controlado por el reloj
- o **cDNA** Ácido desoxirribonucleico complementario
- o **CKI** Caseína kinasa I
- o **CRE** Elementos de respuesta a calcio y AMP cíclico
- o **Cry** Gen *Cryptochrome*
- o **CT** Tiempo circadiano
- o **DA** Dopamina
- o **DDA** 2',3', dideoxyadenosina
- o **DMSO** Dimetil sulfóxido
- o **FAA** Actividad anticipatoria al alimento
- o **FEO** Oscilador sincronizable por el alimento
- o **GMPc** Guanosín monofosfato cíclico
- o **GRE** Elementos de respuesta a glucocorticoides
- o **HIOMT** Hidroxindol-*O*-metiltransferasa
- o **HPLC-ED** Cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica
- o **HPLC-FD** Cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia
- o **ICCs** Células intersticiales de Cajal
- o **ICV** Intracerebroventricular
- o **IP** Intraperitoneal
- o **K_m** Constante de Michaelis
- o **LEO** Oscilador sincronizable por la luz
- o **L-NAME** L-nitroarginina metilester
- o **LRM** Módulo sensible a la luz
- o **MEL** Melatonina
- o **MMC** Complejo motor mioeléctrico
- o **NA** Noradrenalina
- o **NADA** N-acetil dopamina

- o **NO** Óxido nítrico
- o **NOS** Óxido nítrico sintetasa
- o **NPY** Neuropeptido Y
- o **NSQ** Núcleo supraquiasmático
- o **ODQ** 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
- o **PACAP** Polipéptido activador de adenilato ciclasa hipofisiaria
- o **PCA** Ácido perclórico
- o ***Per*** Gen *Period*
- o **qRT-PCR** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
- o **RT-PCR** Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
- o **τ** Período
- o **TPH** triptófano hidroxilasa
- o **TTX** Tetrodotoxina
- o **TGI** Tracto gastrointestinal
- o **VIP** Péptido intestinal vasoactivo
- o **Vmax** Velocidad máxima
- o **ZT** Zeitgeber time

ÍNDICE

<u>I. INTRODUCCIÓN</u>	1
1. SISTEMA CIRCADIANO	3
1.1. Organización general del sistema circadiano	3
1.2. Osciladores circadianos	5
1.2.1. Mecanismos moleculares del reloj circadiano	8
1.3. Sincronizadores externos	10
1.3.1. El ciclo luz/oscuridad como sincronizador	10
1.3.2. Sincronización por la alimentación	11
1.4. Sincronizadores endógenos	13
1.4.1. Melatonina	13
1.4.1.1. Síntesis y degradación	13
1.4.1.2. Receptores	17
1.4.1.3. Efectos biológicos	18
1.4.2. Orexinas	19
1.4.2.1. Síntesis y degradación	19
1.4.2.2. Receptores	19
1.4.2.3. Efectos biológicos	20
1.4.3. Ghrelina	21
1.4.3.1. Síntesis y degradación	23
1.4.3.2. Receptores	23
1.4.3.3. Efectos biológicos	24
2. TRACTO GASTROINTESTINAL	26
2.1. Anatomía general	26
2.2. Motilidad intestinal	28
2.2.1. Regulación neural de la motilidad intestinal.	
Sistema nervioso entérico	30
2.2.2. Regulación neuroendocrina de la motilidad intestinal	31
2.3. El TGI y la organización funcional del sistema circadiano	33
3. EL CARPÍN (<i>Carassius auratus</i>)	35
3.1. Características generales	35
3.2. El tracto gastrointestinal	36
<u>II. OBJETIVOS</u>	39

III. <u>RESULTADOS</u>	43
1. OSCILADORES CIRCADIANOS DEL CARPÍN (<i>Carassius auratus</i>): SINCRONIZACIÓN POR FACTORES EXÓGENOS (CICLO LUZ/OSCURIDAD Y HORARIO DE ALIMENTACIÓN) Y ENDÓGENOS (OREXINA Y GHRELINA)	45
1.1. Resumen	47
1.2. Light-dark cycle and feeding time differentially entrains the gut molecular clock of the goldfish (<i>Carassius auratus</i>)	53
1.3. Orexin as an input of circadian system in goldfish: Effects on clock gene expression and locomotor activity rhythms.	63
1.4. Crosstalking between the “gut-brain” hormone ghrelin and the circadian system in the goldfish. Effects on clock gene expression and food anticipatory activity.	73
2. FUNCIONALIDAD DE ENZIMAS DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE MELATONINA (AANAT Y HIOMT): CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS ISOFORMAS DE LA AANAT Y FUNCIONES ALTERNATIVAS EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL DEL CARPÍN (<i>Carassius auratus</i>)	85
2.1. Resumen	87
2.2. The Arylalkylamine-N-Acetyltransferase (AANAT) acetylates dopamine in the digestive tract of goldfish: A role in intestinal motility.	93
2.3. Dopamine modulates gut motility in goldfish (<i>Carassius auratus</i>) via D ₁ -like receptors.	101
IV. <u>DISCUSIÓN</u>	113
1. EL SISTEMA CIRCADIANO EN EL CARPÍN ESTÁ FORMADO POR UNA RED DE OSCILADORES ENDÓGENOS SINCRONIZADOS A DISTINTAS SEÑALES	116
1.1. El intestino del carpín se sincroniza al fotoperiodo y a la hora de alimentación.	117
1.1.1. Regulación por el fotoperiodo y la hora de alimentación de Per1a y Cry3.	117
1.1.2. Regulación por el fotoperiodo y la hora de alimentación de Per3.	118

1.1.3. Señales “no diarias” que pueden producir sincronización de los genes reloj.	119
1.2. La regulación de la expresión de <i>Per2a</i> indica que a diferencia del pez cebra en el carpín no todas las células son fotosensibles.	120
1.3. Interacción de las hormonas orexigénicas (orexina y ghrelina) con el sistema circadiano del carpín.	122
1.3.1. Interacciones con la expresión de genes reloj.	122
1.3.2. Comunicación entre regiones centrales y periféricas (interacciones orexina-ghrelina).	125
1.3.3. Interacciones con los ritmos diarios de actividad locomotora y el establecimiento de la FAA.	126
1.4. Los genes <i>Per</i> parecen ser dianas comunes de distintas señales sincronizadoras.	127
2. ENZIMAS DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE LA MELATONINA EN EL TGI	129
2.1. Actividades AANAT y HIOMT en el TGI del carpín y funciones alternativas para la AANAT.	129
2.2. Dopamina y motilidad intestinal en el carpín: distribución de receptores dopaminérgicos y mecanismo de acción de la dopamina.	133
<u>V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS</u>	139
<u>VI. RESUMEN / GENERAL SUMMARY</u>	149
<u>VII. BIBLIOGRAFÍA</u>	167

I. INTRODUCCIÓN

1. SISTEMA CIRCADIANO

1.1. ORGANIZACIÓN GENERAL DEL SISTEMA CIRCADIANO

Los movimientos de rotación y traslación de la Tierra, y el movimiento lunar a su alrededor generan cambios cíclicos que condicionan en buena medida numerosas funciones vitales de los organismos, que hemos desarrollado la capacidad de percepción y anticipación a estos cambios, generando respuestas rítmicas comportamentales y fisiológicas con un fuerte carácter adaptativo (Madrid, 2006). En este sentido, en Cronobiología (del griego *kronos* -tiempo, *bios* -vida y *logos*, ciencia), se considera que los ritmos no son respuestas pasivas a los cambios cíclicos ambientales sino una anticipación a los mismos.

Los ritmos biológicos se caracterizan mediante los siguientes parámetros (Koukkari y Sothorn, 2006.):

- **Periodo (τ):** intervalo de tiempo entre dos acontecimientos idénticos, es decir, el tiempo necesario para que ocurra un ciclo completo.
- **Frecuencia ($1/\tau$):** número de ciclos por unidad de tiempo.
- **Acrofase (Φ):** punto temporal del ritmo donde tiene lugar el máximo.
- **Batifase:** punto temporal del ritmo donde tiene lugar el mínimo (valle).
- **Fase (f):** define un punto de referencia temporal de un ritmo. El valor mínimo es la batifase y el máximo (cuando el perfil es sinusoidal) es la acrofase.
- **Nivel medio (mesor):** el valor medio de la variable estudiada, calculado a lo largo de un periodo completo.
- **Amplitud (A):** distancia entre el mesor y el valor máximo alcanzado por la variable cuando el ritmo es sinusoidal. Si el perfil no es sinusoidal es la distancia entre los valores máximo y mínimo.

I. INTRODUCCIÓN

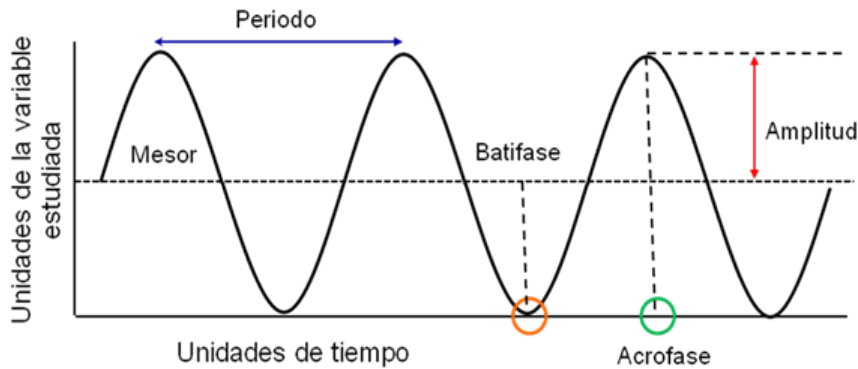


Figura 1. Representación de los principales parámetros que caracterizan un ritmo sinusoidal.

Uno de los métodos matemáticos más empleados para analizar ritmos es el cosinor, que ajusta los valores a funciones sinusoidales teniendo en cuenta el mesor, la amplitud, la frecuencia y la acrofase (Nelson et al., 1979).

Los ritmos biológicos pueden clasificarse, según la duración de sus periodos, en ultradianos (duración inferior a 20h), infradianos (duración superior a 28h) y circadianos (del latín *circa diem*, cercano a un día, con periodicidad entre 20 y 28h), siendo estos últimos los mejor conocidos habiéndose descrito en la mayoría de los eucariotas (Aschoff, 1981), cianobacterias y en el reino *Archae* (Johnson et al., 1996). En función del origen del ritmo, pueden clasificarse en endógenos, cuando persisten en condiciones ambientales constantes, o exógenos, si se generan como respuestas pasivas a las variaciones de un factor ambiental, cuya ausencia provoca la extinción inmediata del ritmo. El carácter endógeno de un ritmo circadiano implica la existencia de un mecanismo auto-sostenible de 24h, también denominado “reloj” circadiano (Mendoza y Challet, 2009, Pittendrigh, 1993) cuyo funcionamiento periódico se mantiene invariable (con un periodo cercano a 24 horas) en ausencia de un sincronizador externo, es decir, en “curso libre” (*free-running*) (Aschoff, 1981). La exposición a estímulos rítmicos externos (sincronizadores o *zeitgebers*) puede modificar el funcionamiento de los relojes endógenos llegando, tras pocos días de exposición, a igualarse el periodo del reloj con el del estímulo ambiental (sincronización o encarrilamiento) (Cahill y Besharse, 1991). Los ritmos endógenos pueden compensar los cambios de temperatura, es decir, apenas se producen cambios de periodo a distintas temperaturas ambientales. En ocasiones algunos estímulos rítmicos generan un ritmo observable, pero no sincronizado, son procesos de “enmascaramiento” en los que al retirar el estímulo no se mantiene la fase con el *zeitgeber* (Cambras Riu, 2006).

I. INTRODUCCIÓN

En resumen, podemos identificar los siguientes elementos principales en la generación y regulación de la ritmicidad circadiana (Figura 2):

1) unas “vías de entrada” (*inputs*), estímulos ambientales o endógenos que actúan como sincronizadores (*zeitgebers*).

2) unos "marcapasos" (*pacemakers*): sistemas capaces de autogenerar oscilaciones rítmicas.

3) unas “vías de salida” (*outputs*) en forma de ritmos observables.

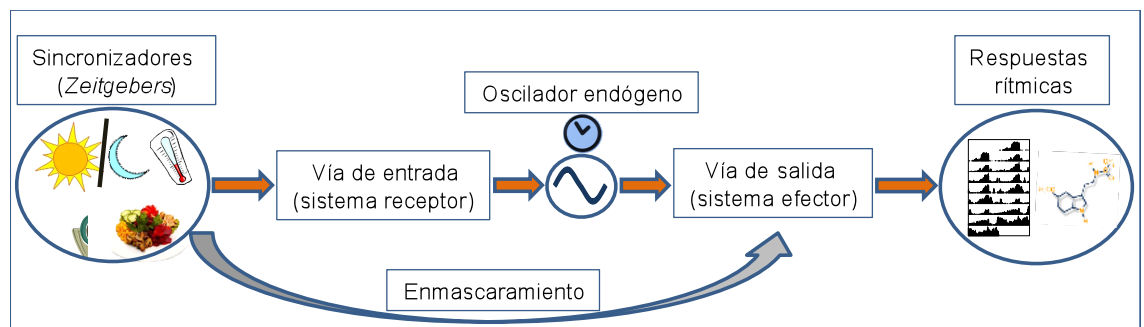


Figura 2. Elementos que participan en la generación y regulación de un ritmo circadiano.

1.2. Osciladores circadianos

La organización anatómica y funcional de los osciladores en el sistema circadiano muestra importantes diferencias entre grupos animales. La organización básica de los mamíferos, con el ciclo luz/oscuridad como sincronizador, se centra en un oscilador central principal, el núcleo supraquiasmático hipotalámico (NSQ), capaz de mantener su ritmicidad *in vitro* (Liu et al., 2007), y encargado de generar y coordinar a otros osciladores y a numerosos procesos fisiológicos rítmicos (Figura 3) (Hastings et al., 2003). Sin embargo, el modelo actual aplicable a vertebrados no mamíferos, incluidos los peces, propone una organización circadiana no jerarquizada, formada por múltiples osciladores acoplados entre sí, siendo la retina, el complejo pineal y ciertos núcleos hipotalámicos los mejor conocidos (Idda et al., 2012, Noche et al., 2011).

I. INTRODUCCIÓN

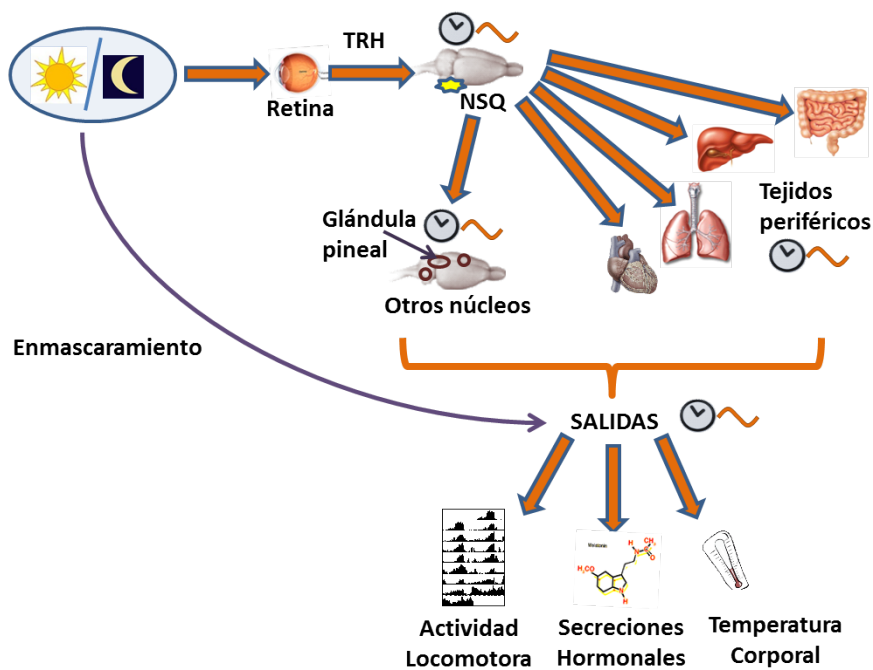


Figura 3. Modelo clásico de organización del sistema circadiano de mamíferos con el ciclo luz-oscuridad como principal factor sincronizador. NSQ: núcleo supraquiasmático, TRH: tracto retino-hipotalámico. Los osciladores centrales y periféricos son sincronizados por el NSQ (modificado de Feliciano 2009).

La retina es una estructura que muestra ritmicidad diaria en numerosos procesos (Iuvone et al., 2005), identificada como oscilador en 1983 por (Besharse y Iuvone) al describir un ritmo diario de actividad arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT) en retinas de *Xenopus laevis* en cultivo. Esta actividad enzimática rítmica está controlada por un reloj localizado en los fotorreceptores retinianos, y genera la síntesis rítmica de melatonina (Cahill y Besharse, 1993). La existencia de este reloj circadiano se ha demostrado posteriormente en representantes de varias clases de vertebrados, incluyendo las aves (Ivanova y Iuvone, 2003), mamíferos (Tosini y Menaker, 1996) y los peces (Lopez-Patino et al., 2011a, Velarde et al., 2009b).

La pineal, directamente fotosensible en algunos anfibios, reptiles y peces, posee todos los elementos de un sistema oscilador completo. Los pinealocitos reciben directamente la presencia o ausencia de luz en el ambiente (vía de entrada), contienen los mecanismos moleculares necesarios para generar un ritmo (oscilador), y sintetizan melatonina de forma rítmica (vía de salida) (Falcon, 1999, Falcon et al., 2007a). En los peces el NSQ no parece funcionar como un verdadero oscilador, si bien estudios recientes

I. INTRODUCCIÓN

en el pez cebra muestran que esta región hipotalámica puede ser relevante para la expresión rítmica de determinados genes en la pineal (Noche et al., 2011), habiéndose propuesto recientemente a dicho NSQ como marcapaso circadiano en un pez plano (*Paralichthys olivaceus*) (Watanabe et al., 2012).

Numerosos estudios realizados en los últimos años demuestran la existencia de osciladores circadianos localizados en la periferia. Los primeros datos proceden de estudios realizados en mamíferos que identificaron osciladores en el hígado, corazón, músculo, tejido adiposo, páncreas, riñón, pulmones, ovario y glándula suprarrenal (Balsalobre, 2002, Bass y Takahashi, 2010, Muhlbauer et al., 2004, Peirson et al., 2006, Zvonic et al., 2006), si bien se han ampliado también a otros grupos de vertebrados (Kubo et al., 2010, Singh et al., 2013, Vallone et al., 2007). Estos osciladores periféricos en ocasiones presentan ritmicidad propia, sin que aparentemente se encuentren sincronizados entre sí ni con los osciladores centrales (Pardini y Kaeffer, 2006), aunque algunos estudios en mamíferos proponen una comunicación con el reloj central que los controlaría a través de señales de tipo endocrino, como la liberación de glucocorticoides (Balsalobre et al., 2000, Chung et al., 2011). Así mismo se ha planteado una sincronización directa de los osciladores periféricos a los estímulos ambientales, como la temperatura o la hora de alimentación (Brown et al., 2002, Mendoza, 2007, Vallone et al., 2007). En los peces se han identificado osciladores periféricos en órganos como el corazón, el bazo y la vesícula biliar (Cavallari et al., 2011, Kaneko et al., 2006), el hígado y el intestino (Feliciano et al., 2011, Velarde et al., 2009b, Vera et al., 2013), el ovario y el riñón (Martin-Robles et al., 2012).

I. INTRODUCCIÓN

1.2.1 Mecanismos moleculares del reloj circadiano

Los fundamentos moleculares de la generación de ritmicidad por los relojes biológicos están muy conservados a lo largo de la evolución (desde organismos unicelulares hasta mamíferos), y consisten en un sistema de bucles de retroalimentación positiva y negativa entre los procesos de transcripción y transducción de los llamados genes reloj y sus productos proteicos con un periodo aproximado de 24 horas (Panda et al., 2002) (Figura 4).

Los principales bucles de retroalimentación en mamíferos están formados por elementos positivos, como los genes *Clock* (*Circadian locomotor cycle kaput*) y *Bmal1* (*Brain and muscle Arnt-like protein*), que son factores de transcripción con dominios básicos HLH (*Helix-Loop-Helix*) y dominios PAS (*Period-Arnt-Single*), que les confieren la capacidad de unión al ADN y de dimerización con otras proteínas, respectivamente. Los productos proteicos de *Clock* y *Bmal1* se heterodimerizan y facilitan la expresión de los elementos negativos del bucle, los genes *Period* (*Per1*, *Per2*, *Per3*) y *Cryptochrome* (*Cry1* y *Cry2*), por reconocimiento de secuencias reguladoras llamadas *E-box* (secuencias consenso, CACGTG) en los promotores de dichos genes. Las proteínas PER y CRY se translocan al citoplasma donde PER se fosforila por una serie de caseínas quinasas I (Cl_{ϵ} y Cl_{δ}), y los complejos resultantes pasan nuevamente al núcleo, donde inhiben la transcripción mediada por CLOCK:BMAL1, inhibiendo así su propia expresión (Hastings, 2000, Reppert y Weaver, 2002). Tras la fosforilación por las caseína kinasas, PER y CRY son degradadas vía proteasoma (Ko y Takahashi, 2006), mecanismo fundamental para mantener en equilibrio el sistema de auto-regulación del reloj (Okamura et al., 2002).

El bucle negativo principal, que genera un ritmo diario de expresión de *Per* y *Cry*, está acompañado por bucles accesorios que permiten estabilizar la duración del ciclo, de los cuales uno de los mejor conocidos implica a *Rev-erba* (también conocido como NR1D1; *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1*) y $ROR\alpha$ (*retinoid-related orphan receptor α*), proteínas pertenecientes a la superfamilia de receptores huérfanos nucleares, que funcionan como factores de transcripción inducibles por ligando. La transcripción de estos factores también está regulada por CLOCK y BMAL1, existiendo elementos RORE (*retinoic acid-related orphan receptor response element*) en el promotor del gen *Bmal1* que responden a las proteínas $ROR\alpha$ (activadoras) y *Rev-erba* (inhibidoras). La unión de Rev-

I. INTRODUCCIÓN

erba al elemento de respuesta RORE inhibe directamente la transcripción de *Bmal1*, mientras que la unión de ROR α la activa (Ko y Takahashi, 2006, Reppert y Weaver, 2002, Sato et al., 2004). Este ciclo genera el pico de expresión de *Bmal1* en antifase con el pico de expresión de los elementos negativos, *Cry* y *Per* (Hastings et al., 2008a, Iuvone et al., 2005).

Tanto los factores ROR α y Rev-erba como los dímeros de BMAL1/CLOCK activan la transcripción vía secuencias RORE o *E-box* en los promotores de los denominados genes controlados por el reloj (CCGs, *clock-controlled genes*), permitiendo la regulación circadiana de genes cuya expresión genera una salida del oscilador en forma de un ritmo observable (Burris, 2008, Teboul et al., 2008). Algunos de los CCGs que se expresan rítmicamente en fase con *Per* y *Cry* (Hastings et al., 2003) corresponden a enzimas metabólicas, canales iónicos y péptidos con distinta distribución tisular (Kovac et al., 2009). Entre los CCGs más estudiados están los genes que codifican para *arginina-vasopresina* (AVP), el gen de la proteína DBP (*D element-binding protein*) y el gen de la enzima arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AANAT) (Hastings et al., 2008a,b, Iuvone et al., 2005).

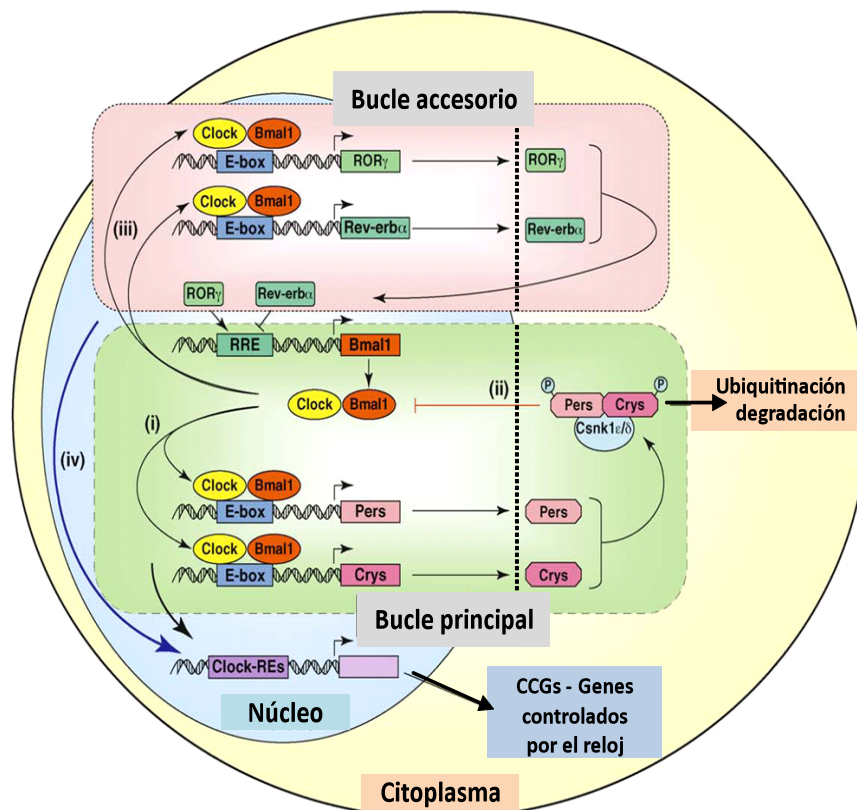


Figura 4. Modelo del mecanismo molecular de funcionamiento del oscilador celular en mamíferos. (Modificado de Nader et al., 2010)

I. INTRODUCCIÓN

El mecanismo molecular de funcionamiento de los relojes biológicos en los peces se ha investigado casi exclusivamente en el pez cebra (*Danio rerio*, Cahill et al., 2002, Kobayashi et al., 2000), si bien es cierto que recientemente se han clonado diversos genes reloj en otros teleósteos y se ha investigado su sincronización por los factores ambientales de fotoperiodo y temperatura. Entre ellos uno de los más estudiados es el carpín, *Carassius auratus*, (Azpeleta, 2012, Feliciano et al., 2011, Hoskins y Volkoff, 2012, Velarde et al., 2009b) como el salmón del Atlántico, *Salmo salar* (Davie et al., 2009), el lenguado, *Solea senegalensis* (Martin-Robles et al., 2011); la trucha arco-iris, *Oncorhynchus mykiss* (Lopez-Patino et al., 2011b); la lubina, (Sanchez et al., 2010); un pez cavernícola, *Phreatichthys andruzzii* (Cavallari et al., 2011) ; y la dorada, *Sparus aurata* (Vera et al., 2013); encontrando en todos los casos genes homólogos a los genes reloj de mamíferos, salvo que en mayor número de copias como es propio de los teleósteos, a consecuencia de la duplicación génica que tuvo lugar próxima al origen de este linaje de peces (Hoegg et al., 2004).

1.3. Sincronizadores externos

1.3.1. El ciclo luz/oscuridad como sincronizador

En los peces, al igual que en el resto de los vertebrados, un gran número de ritmos biológicos están sincronizados al ciclo luz-oscuridad (Falcon et al., 2007b), mostrando periodos en torno a 24 horas. Entre estos ritmos destacamos ritmos comportamentales (alimentación, actividad locomotora), fisiológicos (temperatura corporal, pigmentación, reproducción) y endocrinos (cortisol, melatonina) (Boeuf y Le Bail, 1999). Algunos estudios han demostrado que la duración del periodo de luz y las transiciones entre las fases de luz y oscuridad actúan como importantes agentes sincronizadores del oscilador sincronizable por la luz (*Light entrainable oscillator* - LEO) (Sosniyenko et al., 2009).

El ciclo L/D es un potente sincronizador de los osciladores situados en el sistema nervioso central, y en particular del NSQ. La ruta de entrada de la información lumínica hasta el NSQ se ha estudiado con detalle en los mamíferos, conociéndose las vías de comunicación desde la retina, los tipos celulares implicados y los neurotransmisores que intervienen en los distintos puntos de relevo (Hastings et al., 2003, Reppert y Weaver, 2001).

I. INTRODUCCIÓN

En mamíferos se cree que los osciladores localizados en la periferia no se pueden sincronizar directamente al ciclo L/D. Sin embargo, en una organización jerárquica del sistema circadiano, como la existente en los mamíferos, se ha sugerido que el NSQ tras integrar la información lumínica podría enviar esta información a osciladores periféricos (Buijs y Kalsbeek, 2001, Reppert y Weaver, 2002). Las proyecciones neuronales del NSQ a otros núcleos hipotalámicos (principalmente al núcleo paraventricular) permiten la salida de información, que podría finalmente alcanzar localizaciones periféricas (Buijs y Kalsbeek, 2001). Los osciladores periféricos pueden así mismo señalar el estado metabólico de los organismos posiblemente utilizando las mismas vías, además de otras señales metabólicas y/o endocrinas, generando respuestas de retroalimentación al hipotálamo y a otros núcleos encefálicos (Buijs y Kalsbeek, 2001, Reppert y Weaver, 2002).

Sin embargo en peces se cree que el sistema circadiano es menos jerárquico, además en algunas especies semitransparentes como el pez cebra la luz podría llegar directamente a todos los tejidos del organismo, si así fuera los tejidos periféricos podrían ser sincronizados directamente por el ciclo luz-oscuridad (Pando et al., 2001). En el pez cebra, se ha demostrado que ciertos osciladores pueden ser sincronizados directamente a la luz, tanto en líneas celulares (Tamai et al., 2005) como en embriones (Tamai et al., 2004) o tejidos en cultivo (Whitmore et al., 2000). En los últimos años se han identificado proteínas fotorreceptoras en tejidos periféricos de teleósteos, como la TMT-opsina (*teleost multiple tissue opsin*) y las melanopsinas, que a través de un módulo sensible a la luz promueven la expresión de *Per2* inducida por la luz en el pez cebra? Y el cavefish? (Cavallari et al., 2011).

1.3.2. Sincronización por la alimentación

Aunque el ciclo luz-oscuridad es el principal sincronizador externo en la organización circadiana de la mayoría de los animales, no es el único. En muchas especies, el acceso periódico al alimento también es un factor capaz de sincronizar distintas variables fisiológicas y comportamentales (Feliciano et al., 2011, MADRID, 2001, Mendoza et al., 2008b, Sanchez-Vazquez et al., 1995b). La importancia de esta sincronización es esperable ya que el acceso a la comida es uno de los factores más relevantes que afectan a la supervivencia de los animales, por lo que el desarrollo de sistemas que permiten sincronizar la actividad, niveles hormonales y otras variables fisiológicas con la hora de alimentación, optimiza el aprovechamiento máximo del alimento ingerido. En definitiva,

I. INTRODUCCIÓN

conocer y anticipar la hora de alimentación permite a los animales preparar su organismo para optimizar tanto la captura del alimento como su posterior utilización (Sánchez-Vázquez et al., 1997).

Los osciladores que se sincronizan al horario de alimentación son conocidos de forma general como *Food entrainable oscillators* (FEOs). La existencia de FEOs se sugirió a partir de la observación de la actividad anticipatoria al alimento (FAA, *Food Anticipatory Activity*) mostrada por diferentes especies de vertebrados en forma de un incremento de la actividad locomotora en las 2-3 horas previas a la hora de administración del alimento (Stephan, 2002) y demostrado también en peces (Sánchez-Vázquez et al., 1997, SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2001). En la actualidad no se ha podido asignar una localización específica para los osciladores del FEO, a pesar de distintos intentos realizados lesionando diferentes núcleos encefálicos en ratas (Mendoza, 2007), que han excluyeron su localización central y sugirieron una localización periférica . No obstante, posteriores estudios plantean la posibilidad de que los osciladores del FEO no tengan una localización única, sino que formarían parte de una red interconectada entre estructuras centrales y periféricas (Davidson, 2006, Feliciano et al., 2011, Gunapala et al., 2011, Ribeiro et al., 2009).

La FAA representa una vía robusta de salida del sistema circadiano cuyo estudio ha contribuido a la comprensión de las conexiones funcionales entre osciladores y vías de salida. Así, estudios iniciales en mamíferos demostraron la relevancia de la expresión rítmica de genes reloj, como *Per2* y *Bmal1*, en la generación de la FAA (Feillet et al., 2006, Fuller et al., 2008). Además, hormonas orexigénicas, como las orexinas y la ghrelina, se han propuesto como señales de entrada y salida de la propia FAA (Akiyama et al., 2004, LeSauter et al., 2009). Así mismo, algunos estudios señalan al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal como posible agente sincronizador del FEO (Girotti et al., 2009).

En los peces se han descrito ritmos diarios de actividad sincronizados al horario de alimentación, y FAA en varias especies de teleósteos. La capacidad de anticipación a la hora de alimentación fue demostrada por primera vez en peces por Davis (1964). Desde entonces, la FAA ha sido descrita en distintos grupos de vertebrados (Mistlberger, 1994) incluidas varias especies de peces tales como *Fundulus heteroclitus* y *Lepomis macrochirus* (Davis y Bardach, 1965), *Periophthalmus cantonensis* (Nichikawa y Ishibashi, 1975), *Misgurnus anguillicaudatus* (Naruse y Oishi, 1994), *Salmo salar* (Juell et al., 1994), *Dicentrarchus labrax* (Sanchez-Vazquez et al., 1995a), *Carassius auratus* (Sánchez-Vázquez

I. INTRODUCCIÓN

et al., 1997), *Notemigonus crysoleucas* (Reebs y Lague, 2000), *Tinca tinca* (Herrero et al., 2005), y *Sparus aurata* (Sánchez et al., 2009). Además la aparición de la FAA en peces se ha descrito tanto bajo la influencia del ciclo luz-oscuridad como en condiciones de iluminación constante en el carpín dorado (*Carassius auratus*) (Sánchez-Vázquez et al., 1997) y en el pez barómetro (*Misgurnus anguillicaudatus*) (Naruse y Oishi, 1994) entre otros. Si bien es cierto, que cuando ambos sincronizadores están presentes (fotoperiodo y alimentación) y el horario de alimentación coincide con la fase inactiva del animal toma más tiempo y por tanto son necesarios más ciclos para la expresión de la FAA (Sánchez-Vázquez, 2001).

Otros parámetros fisiológicos que también muestran respuestas de sincronización a la alimentación incluyen la secreción de amilasa, los niveles de proteasa alcalina, la absorción de carbohidratos, el contenido hipotalámico de NPY y de melatonina gastrointestinal (Lopez-Olmeda et al., 2009, Vera et al., 2007). Estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación muestran la relevancia del horario de alimentación en la expresión rítmica de genes reloj tanto en localizaciones centrales (hipotálamo y techo óptico) como en periféricas, (hígado e intestino) (Feliciano et al., 2011, Nisembaum et al., 2012).

1.4. SINCRONIZADORES ENDÓGENOS

1.4.1. Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina, MEL) es una indolamina identificada por primera vez por el dermatólogo Aaron Lerner y colaboradores (1958), cuya denominación hace referencia a su capacidad para agregar la melanina en los melanóforos dérmicos de las larvas de los anfibios anuros. Se trata de una molécula ampliamente distribuida en el planeta, habiéndose encontrado en todos los vertebrados estudiados (Reiter, 1993), así como en algunos invertebrados, bacterias, protozoos (Hardeland y Poeggeler, 2003) e incluso en algunas plantas (Hardeland et al., 2007).

1.4.1.1. Síntesis y degradación

Los principales órganos productores de MEL son la glándula pineal y la retina (Falcón, 1999, Tosini y Menaker, 1998). En aves y mamíferos la mayor parte de la MEL plasmática es producida por la pineal (Cassone, 1990, Falcón, 1999), mientras que en algunos anfibios la retina es la principal fuente (Delgado y Vivien-Roels, 1989, Wright et al.,

I. INTRODUCCIÓN

2006). En peces se han descrito ambas opciones, siendo sintetizada principalmente en la pineal del carpín (Kezuka et al., 1992) y la lubina (Bayarri et al., 2003), o con altos niveles de secreción por la retina, como se ha sugerido en la tilapia (*Oreochromis niloticus*) y el pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Migaud et al., 2007). Otros tejidos carentes de estructuras fotorreceptoras también se han propuesto como lugares de síntesis de MEL, de los cuales el tracto gastrointestinal es el más estudiado (Bubenik y Pang, 1997, Munoz et al., 2009).

La síntesis de MEL sigue un patrón rítmico diario con valores nocturnos superiores a los diurnos, tanto en especies diurnas como nocturnas e independientemente del régimen fotoperiódico al que estén expuestos los animales (Pevet, 1998, Reiter, 1991). Su elevada liposolubilidad le permite cruzar las membranas biológicas, entrando fácilmente en células o fluidos corporales, de modo que su ritmo diario de síntesis y liberación conduce información circadiana a todos los órganos y tejidos, lo que ha permitido proponer a esta indolamina como una señal neuroendocrina clave en la organización funcional del sistema circadiano (Falcón, 1999). En los peces la síntesis rítmica de MEL es un importante marcador de ritmicidad circadiana (Zhdanova y Reeb, 2006), habiéndose sugerido patrones distintos de organización circadiana en función de la regulación de la síntesis de MEL (Migaud et al., 2007). El modelo de los salmónidos es de tipo descentralizado en el que tanto la glándula pineal como los ojos responden a la luz de forma independiente. En especies como la lubina o el bacalao, a pesar de la fotosensibilidad de la glándula pineal, existe una dependencia funcional de los fotorreceptores retinianos y encefálicos profundos a la hora de establecer el ritmo de síntesis de MEL. Finalmente, en especies como la tilapia y el pez gato, la glándula pineal es parcial o totalmente insensible a la luz y la secreción rítmica de MEL está controlada por otra/s estructura/s fotosensibles.

La ruta biosintética de MEL, muy conservada en la filogenia, consta de cuatro etapas consecutivas (Figura 5). En primer lugar el triptófano captado de la circulación sanguínea es transformado en 5-hidroxitriptófano por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH), y a continuación es descarboxilado por acción de la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) produciendo serotonina. La enzima arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AANAT) acetila la serotonina en su extremo N-terminal, formando N-acetilserotonina, y en la última etapa de la ruta la actividad hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) metila a la N-acetilserotonina en el grupo hidroxilo en la posición 5 del anillo indólico, produciendo MEL (Figura 5).

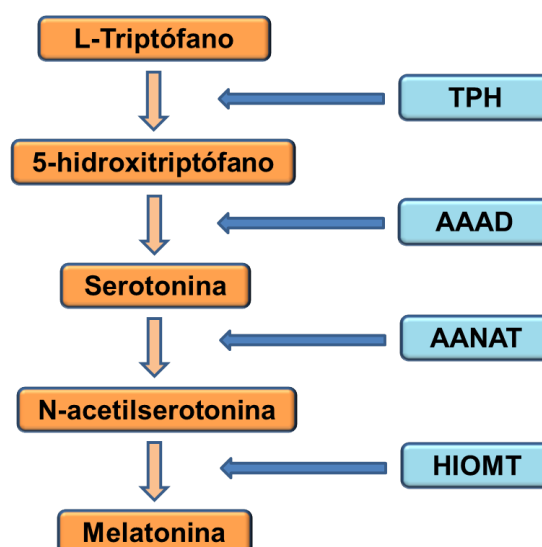


Figura 5. Ruta biosintética de melatonina. TPH, triptófano hidroxilasa; AAAD, L-aminoácido aromático descarboxilasa; AANAT, arilalquilamina-N-acetiltransferasa; HIOMT, hidroxindol-O-metiltransferasa.

La vida media de la MEL en el plasma de los mamíferos es de aproximadamente 20 minutos (Gibbs y Vriend, 1981), y se cataboliza siguiendo distintas vías. En la periferia, la MEL es catabolizada principalmente en el hígado, donde experimenta una hidroxilación en la posición 6 del anillo indólico y una posterior conjugación con grupos sulfato o glucuronato, por la acción consecutiva de enzimas de la familia citocromo P₄₅₀, monooxigenasas y sulfatotransferasas (Pandi-Perumal et al., 2006), generando productos fácilmente excretables por la orina (Gibbs y Vriend, 1981). En la degradación intraocular e intrapineal una desacetilasa específica transforma la MEL en 5-metoxitriptamina que, por la acción de una monoamino oxidasa, se transforma en ácido 5-metoxiindolacético, que es fácilmente excretable (Cahill y Besharse, 1989, Hardeland, 2008); ruta que también tiene lugar en otros tejidos, pero con la acción de enzimas inespecíficas (Hardeland y Poeggeler, 2007). En el cerebro, el catabolismo de la MEL contenida en el líquido cefalorraquídeo produce kinuraminas como principales metabolitos, como la AFMK (*N*1-acetil-*N*2-formil-5-metoxikinuramina) y la AMK (*N*1-acetil-5-metoxikinuramina) (Hardeland y Poeggeler, 2007, Hirata et al., 1974).

La AANAT es una de las enzimas limitantes de la ruta de síntesis de MEL, pues tanto su ARNm como su actividad varían a lo largo del ciclo luz/oscuridad, aumentando de forma

I. INTRODUCCIÓN

pronunciada en la fase oscura del ciclo (Falcón, 1999), lo que determina el ritmo de MEL tanto en la pineal como en la retina (Iuvone et al., 2005, Klein, 2007). Pertenecen a una familia de enzimas que utilizan el acetil coenzima A como donante de acetilo en la acetilación de grupos amino de compuestos aromáticos (Deguchi, 1992).

Las formas más primitivas de las AANATs carecen de determinadas regiones implicadas en la unión de los ligandos y en la actividad catalítica, lo que sugiere para ellas funciones diferentes a la síntesis de MEL, como por ejemplo en la detoxificación de aminas (Coon y Klein, 2006). En vertebrados, las AANATs fueron inicialmente clonadas en mamíferos (Coon et al., 1995), pero actualmente se conocen secuencias pertenecientes a otras clases de vertebrados, incluyendo aves (Bernard et al., 1997), anfibios (Isorna et al., 2006) y peces teleósteos (Coon et al., 1999, Isorna et al., 2009, Vuilleumier et al., 2007, Zilberman-Peled et al., 2004). Los teleósteos constituyen un caso particular en los vertebrados, ya que poseen dos familias de AANATs, la AANAT1 y la AANAT2, justificable en base a la duplicación genómica que tuvo lugar próxima al origen del linaje teleósteo (Coon y Klein, 2006, Hoegg et al., 2004). Algunas familias de teleósteos (percomorfos y salmónidos) presentan además dos subtipos de AANAT1 (a y b) (Falcon et al., 2009), probablemente debido a la segunda duplicación genómica acontecida en los grupos de teleósteos más modernos (Coon y Klein, 2006).

Las dos enzimas AANAT descritas en los teleósteos se diferencian en su distribución tisular. Así, la AANAT1, más parecida a la enzima de los mamíferos, se localiza principalmente en la retina, mientras que la AANAT2 se expresa mayoritariamente en la glándula pineal (Benyassi et al., 2000, Coon et al., 1999). También difieren en su cinética y preferencia de sustratos. La AANAT1 en la retina acetila varias aminas y está implicada en distintas funciones locales (Zilberman-Peled et al., 2011), además de mostrar inhibición por concentraciones elevadas de sustrato (Benyassi et al., 2000, Zilberman-Peled et al., 2004). La AANAT2, que no presenta inhibición por sustratos o productos (Benyassi et al., 2000, Zilberman-Peled et al., 2004), utiliza preferentemente indoletilaminas como sustratos, con alta selectividad para serotonina, lo que favorece su eficiencia en la producción de MEL (Zilberman-Peled et al., 2011). En relación con las cinéticas, la actividad AANAT1 ocular aumenta de manera lineal con la temperatura, alcanzando valores máximos variable dependiendo de la especie (Benyassi et al., 2000, Falcón et al., 1996, Zilberman-Peled et al., 2004). Sin embargo, la AANAT2 muestra distintas temperaturas óptimas

según la temperatura del hábitat de la especie, sugiriendo así un carácter termosensor que permitiría que los niveles circulantes de MEL reflejen también cambios de temperatura ambiental (Benyassi et al., 2000, Cazaméa-Catalan et al., 2012, Coon et al., 1999, Falcon et al., 2009). De este modo la señal melatoninérgica podría señalar al organismo información relativa al momento del día, la época del año o incluso su posición en la columna de agua.

En base a estas diferencias descritas en las dos AANATs de los peces, se ha sugerido una importante diferencia funcional entre ambas enzimas. Así, la AANAT2 de la pineal estaría especializada en la producción de grandes cantidades de MEL, que tendría un papel principalmente endocrino (Falcon et al., 2009), mientras que la AANAT1 de la retina contribuiría más a una síntesis local de MEL pudiendo, además, estar implicada en procesos de detoxificación (Klein, 2006), o incluso catalizar otras reacciones de acetilación (Zilberman-Peled et al., 2006).

En la regulación diaria de la AANAT es bien conocido el papel clave desempeñado por la luz en la sincronización de la actividad enzimática (Falcon et al., 2003, Reppert y Weaver, 2002), así como en su inactivación, induciendo degradación proteolítica de la enzima (Falcon et al., 2001, Gastel et al., 1998). De forma general, el reloj celular genera un ritmo en la transcripción del gen *Aanat* mediante la interacción del dímero BMAL1:CLOCK con un elemento E-box presente en el promotor del gen de la enzima, produciéndose un aumento nocturno tanto del ARNm como de la propia actividad enzimática (Appelbaum et al., 2005, Chong et al., 2000).

1.4.1.2. Receptores

En la actualidad se han identificado dos tipos de receptores de MEL de membrana de alta afinidad denominados Mel_{1a} y Mel_{1b} (MT1 y MT2, respectivamente), ambos pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y que estarían mediando estas acciones de la MEL. Además, existe un tercer tipo, Mel_c, presente en todos los vertebrados (excepto los mamíferos placentarios y marsupiales) (Pevet, 2003, Reppert et al., 1996). Se ha descrito un sitio de unión para MEL (MT3) que, a diferencia de los anteriores, es de baja afinidad y con propiedades enzimáticas de tipo quinona reductasa 2, enzima citosólica implicada en procesos de detoxificación (Mailliet et al., 2005, Nosjean et al., 2000). En los peces se han clonado las secuencias completas o parciales de receptores

I. INTRODUCCIÓN

de MEL en numerosas especies (Confente et al., 2010, Falcon et al., 2007a, Gaildrat et al., 2002, Ikegami, T. et al., 2009a,b, Park et al., 2006, Sauzet et al., 2008)

Los receptores de MEL muestran una amplia distribución en el encéfalo y la retina de todos los vertebrados estudiados, incluyendo los peces, con densidades más elevadas en áreas relacionadas con funciones de percepción e integración visual (Bayarri et al., 2004, Dubocovich y Markowska, 2005, Iigo et al., 2003, López Patiño et al., 2008, Savaskan et al., 2007). En la última década se ha descrito la existencia de receptores o sitios de unión para MEL en ciertas localizaciones periféricas, como el tracto gastrointestinal (Ikegami, T. et al., 2009a,b, Sallinen et al., 2005, Stebelová et al., 2010), riñón, corazón, bazo y branquias (Kulczykowska et al., 2006, López Patiño et al., 2008).

1.4.1.3. Efectos biológicos

El patrón rítmico diario y estacional de secreción de MEL permite sincronizar los cambios fisiológicos a las fluctuaciones ambientales, habiéndose propuesto a esta indolamina como transductor de la información ambiental en vertebrados (Falcon, 1999, Reiter, 1993). Los mamíferos son el grupo más estudiado, siendo la reproducción, el ciclo sueño-vigilia, la hibernación, el equilibrio energético y los cambios estacionales de peso corporal algunas de las funciones estacionales relacionadas con la MEL que más interés han suscitado desde hace décadas en la comunidad científica (Arendt y Skene, 2005, Hardeland, 2008). Además, la MEL desempeña otras acciones en el organismo, entre las que destaca su capacidad protectora frente al daño oxidativo de macromoléculas, células, tejidos, órganos y organismos (Bonnefont-Rousselot y Collin, 2010, Bubenik y Konturek, 2011, Reiter y Tan, 2003, Tan et al., 2010), propiedades antiinflamatorias (Tan et al., 2010) e inmunomoduladoras (Carrillo-Vico et al., 2006). Algunos estudios atribuyen a la MEL un papel reductor de las respuestas al estrés, disminuyendo los niveles de glucocorticoides circulantes por acción directa sobre la glándula adrenal en algunos mamíferos (Appa et al., 2001), o modulando la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en algunas aves y peces (Azpeleta et al., 2010, Saito et al., 2005).

En los peces se ha relacionado a la MEL con funciones estacionales esenciales, como la reproducción, el desarrollo y el crecimiento (Boeuf y Le Bail, 1999, Falcón et al., 2010, Sebert et al., 2008). La MEL, además, está implicada en la regulación de la alimentación y la actividad locomotora, con acciones anorexigénicas y reductoras de la actividad en

teleósteos diurnos (Azpeleta et al., 2010, De Pedro et al., 2008, Pinillos et al., 2001, Rubio et al., 2004) y nocturnos (Lopez-Olmeda et al., 2006).

1.4.2. Orexinas

1.4.2.1. Síntesis y degradación

Las orexinas (orexina A y orexina B) son neuropéptidos identificados por primera vez por Sakurai y colaboradores (1998) en el cerebro de rata, generados por el procesamiento proteolítico de un precursor común (prepro-orexina) (Haynes et al., 1999). La orexina B tiene estructura lineal con un su extremo N-terminal libre, mientras que la orexina A posee dos puentes disulfuros en su estructura que le confieren una mayor resistencia a la degradación por peptidasas inactivadoras, lo que podría justificar la mayor potencia de efectos de la orexina A (Sakurai et al., 1998).

La producción de orexina en mamíferos ocurre principalmente en neuronas del área perifornical y en el hipotálamo lateral y posterior (Date et al., 1999, Elias et al., 1998, Nambu et al., 1999, Peyron et al., 1998). En vertebrados no mamíferos, las neuronas productoras de orexina se localizan principalmente en el hipotálamo, como sucede en anfibios (Shibahara et al., 1999), reptiles (Dominguez et al., 2010), aves (Phillips-Singh et al., 2003, Singletary et al., 2006), y en distintos tipos de peces, cartilaginosos (MacDonald y Volkoff, 2010), pulmonados (López et al., 2009), y teleósteos, como el pez cebra (Kaslin et al., 2004), el carpín (Huesa et al., 2005), el bacalao (Xu y Volkoff, 2007), medaka (*Oryzias Latipes*) (Amiya et al., 2007) y mero de pintas naranjas (*Epinephelus coioides*) (Yan et al., 2011).

Específicamente en los teleósteos, estas neuronas están presentes principalmente en el hipotálamo ventral y posterior (Faraco et al., 2006, Huesa et al., 2005, Kaslin et al., 2004). Las neuronas productoras de orexina tienen una amplia proyección en distintas regiones del sistema nervioso central, como lóbulos olfatorios, núcleo talámico paraventricular, núcleo arqueado, núcleo del rafe y locus coeruleus (Date et al., 1999, Nambu et al., 1999), organización bastante conservada en diferentes vertebrados mamíferos y no mamíferos (Huesa et al., 2005).

1.4.2.2. Receptores

Los receptores de orexinas (OX₁R and OX₂R) pertenecen a la familia de receptores con 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G, mostrando la orexina A mayor

I. INTRODUCCIÓN

afinidad por el receptor OX₁R, mientras la orexina B se une con la misma afinidad a los dos subtipos de receptores (Haynes et al., 1999). La distribución de los receptores de orexinas es amplia en el encéfalo de los vertebrados, siendo el hipotálamo una de las principales regiones que concentra receptores y recibe abundantes proyecciones de neuronas productoras de orexina (Marcus et al., 2001, Sakurai et al., 1998). En los mamíferos, el hipotálamo anterior, y los núcleos ventromedial, paraventricular, dorsomedial y arqueado son las localizaciones principales para estos receptores de orexinas (Sakurai et al., 1998, Trivedi et al., 1998). Se han identificado receptores de orexina en localizaciones periféricas, con una cierta distribución diferenciada para OX₁R y OX₂R. Así, aunque ambos tipos se han observado en hipófisis y adrenal (Jöhren et al., 2001), el subtipo OX₁R está presente en riñón, testículo (Jöhren et al., 2001, Zhang et al., 2005), tiroides, ovario, yeyuno (Jöhren et al., 2001) e islotes pancreáticos (Adeghate et al., 2010), mientras que el subtipo OX₂R parece encontrarse en el pulmón (Jöhren et al., 2001). En vertebrados no mamíferos, hasta la fecha únicamente se ha encontrado el receptor OX₂R, sugiriendo que este subtipo sería el más primitivo, mientras que el OX₁R podría haber evolucionado a partir de una duplicación génica reciente (Wong et al., 2011). En peces, hasta la actualidad se ha encontrado un único tipo de receptor el OX₂R, en especies como el pez cebra (Prober et al., 2006), el pez verde (*Thalassoma pavo*) (Facciolo et al., 2009) y el carpín (Facciolo et al., 2011). De modo general, este receptor se encuentra distribuido por diferentes regiones centrales como el telencéfalo, hipotálamo, tubérculo posterior, núcleos anteriores del tronco encefálico, y también en la hipófisis (Facciolo et al., 2011, Yokogawa et al., 2007).

1.4.2.3. Efectos biológicos

La diversidad de las proyecciones de las neuronas productoras de orexinas y la amplia distribución de sus receptores justifica la variedad de funciones fisiológicas en las que se ve implicado este neuropéptido. El primer efecto identificado de las orexinas fue en la regulación de la ingesta en mamíferos (Sakurai et al., 1998), justificando su denominación procedente del griego *orexis*, que significa apetito. Estudios realizados en distintos vertebrados, incluyendo el carpín, han mostrado su acción orexigénica mediante inyecciones intracerebroventriculares que inducen un aumento en la ingesta, siendo este efecto más potente y de mayor duración con la orexina A que con la orexina B (Dube et al., 1999, Haynes et al., 1999, Sakurai et al., 1998, Volkoff et al., 1999). Este efecto, sin embargo, no se observa en aves (Furuse et al., 1999) que tampoco presentan aumentos en los niveles

I. INTRODUCCIÓN

de ARNm de prepro-orexina en condiciones de ayuno, a diferencia de otros vertebrados (Ohkubo et al., 2002). En el carpín se han descrito interacciones de las orexinas con otros péptidos orexigenicos, como la ghrelina y el NPY, existiendo una estimulación mutua entre ellos (Muroya et al., 2004, Toshinai et al., 2003, Volkoff y Peter, 2001), y acciones sinérgicas de estos reguladores anorexigénicos en el control de la ingesta (Volkoff y Peter, 2001).

Las orexinas también participan en la regulación del ciclo sueño/vigilia en mamíferos, estando implicadas en el mantenimiento del estado de alerta (Chemelli et al., 1999, Mieda et al., 2004, Nakamachi et al., 2006, Yamanaka et al., 2003). De acuerdo con este papel, la orexina aumenta la actividad locomotora tanto en mamíferos (Hagan et al., 1999, Novak y Levine, 2009) como en teleósteos (Nakamachi et al., 2006). Además, la falta de orexinas o de sus receptores genera cuadros narcolépticos o de sueño fragmentado (Appelbaum et al., 2009). Las orexinas también parecen intervenir en la funcionalidad del sistema de recompensa en mamíferos (Fadel y Deutch, 2002, Peyron et al., 1998), la adicción a drogas (Boutrel et al., 2005) y en el funcionamiento cardiovascular (Shirasaka et al., 2003).

Estudios recientes han relacionado a las orexinas con el sistema circadiano en roedores. Se han descrito proyecciones de las neuronas productoras de orexina a la glándula pineal (Appelbaum et al., 2009), y un efecto modulador de este neuropéptido sobre neuronas del NSQ *in vitro* (Klisch et al., 2009). Los niveles de orexina circulantes en mamíferos parecen mostrar variaciones diarias, con valores elevados alrededor del horario de alimentación, cuando ésta se proporciona en horario fijo y durante el periodo activo del día (Akiyama et al., 2004, Marston et al., 2008, Selbach y Haas, 2006, Yoshida et al., 2001). En condiciones de alimentación restringida a un horario fijo, se han observado incrementos significativos de *Fos* en neuronas productoras de orexina en mamíferos (Akiyama et al., 2004, Mieda et al., 2004) y en la expresión hipotalámica de ARNm de orexina en peces (Hoskins y Volkoff, 2012, Xu y Volkoff, 2007, Yan et al., 2011), previos al horario de alimentación. Finalmente, la orexina también se considera relevante en la ejecución de señales procedentes del FEO, aumentando el estado de alerta y la actividad durante el periodo de FAA (Mieda et al., 2004).

1.4.3. Ghrelina

La ghrelina es un péptido identificado por primera vez por Kojima y colaboradores (1999) en el estómago de ratas durante la purificación de un ligando endógeno de

I. INTRODUCCIÓN

receptores huérfanos acoplados a proteína G. En mamíferos consta de 28 aminoácidos, siendo el tercero una serina modificada por un lípido, el ácido acil n-octanoico, característica fundamental para la actividad biológica de esta hormona (Kojima et al., 2001). En los peces la ghrelina puede variar tanto en el número de aminoácidos como en sus modificaciones por ácidos grasos (Amole y Unniappan, 2009, Kaiya et al., 2003a,b,c, Kaiya et al., 2005, Miura et al., 2009, Unniappan et al., 2002, Yeung et al., 2006).

1.4.3.1. Síntesis y degradación

La síntesis de ghrelina se produce en su mayor parte en células tipo P/D1 en la mucosa gástrica de mamíferos (Stengel et al., 2010). La formación de ghrelina con el ácido aciloctanoico es catalizada por la ghrelina-*O*-aciltransferasa (GOAT) (Gutierrez et al., 2008, Yang et al., 2008), enzima miembro de la familia de *O*-aciltransferasas, unidas a membrana, que muestra un elevado nivel de expresión específica en la mucosa gástrica. La GOAT parece desempeñar un papel clave en la regulación de la síntesis de ghrelina, ya que tanto la cantidad como la actividad de esta enzima afectan a los niveles de acil-ghrelina, habiéndose propuesto, además, la existencia de un mecanismo de retroalimentación negativa, por el que niveles elevados de acil-ghrelina inhiben a la GOAT (Yang et al., 2008). La ghrelina es liberada a la circulación sanguínea, a diferencia de las enzimas gástricas que son liberadas al tracto gastrointestinal, pudiendo así circular por todo el organismo (Kojima et al., 2001).

La expresión de ghrelina en mamíferos se ha localizado principalmente en el estómago, pero también en el hipotálamo, hipófisis, hipocampo, corteza cerebral, glándula adrenal, intestino, páncreas y otros, si bien con niveles de expresión más bajos que los observados en el estómago (Gnanapavan et al., 2002, Higgins et al., 2007). En peces los mayores niveles de expresión de ghrelina se encuentran en el estómago y/o intestino anterior, dependiendo de la especie (Breves et al., 2009, Kaiya et al., 2003b, Parhar et al., 2003, Unniappan et al., 2002) aunque también se detecta expresión de esta hormona en centros de integración de señales reguladoras de la ingesta, como el hipotálamo (Feng et al., 2013, Jonsson et al., 2010, Kaiya et al., 2003a, Unniappan et al., 2002, Unniappan y Peter, 2004) (Unniappan et al., 2002, Kaiya et al., 2003a; Feng et al., 2013), (Unniapan et al., 2004; Jönsson et al., 2010).

En el carpín se ha detectado expresión de ghrelina en el encéfalo, concretamente en hipotálamo, bulbo olfatorio y telencéfalo, y en localizaciones periféricas, como la hipófisis,

intestino, hígado, bazo y branquias (Unniapan et al., 2002). En esta especie, inicialmente se clonaron dos secuencias de ghrelina en base a las secuencias existentes en mamíferos (Kojima et al., 2001) y trucha (Kaiya et al., 2003c), una secuencia con 12 y otra con 19 aminoácidos (Unniapan et al., 2002) estructuralmente parecida a la ghrelina de humanos, con cuatro exones y tres intrones cortos (Unniapan et al., 2004). Un estudio posterior purificando la ghrelina nativa del intestino del carpín ha encontrado 11 formas de esta molécula, siendo predominante la forma con 17 aminoácidos (Miura et al., 2009).

El principal factor regulador de la producción de ghrelina es la alimentación (Cummings et al., 2001). La glucemia también se ha sugerido como factor implicado, con reducciones de los niveles de ghrelina circulantes en respuesta a aumentos de glucosa en sangre (McCowen et al., 2002, Shiiya et al., 2002)

1.4.3.2. Receptores

El receptor de ghrelina, *growth hormone secretagogue receptor* (GHSR), es un miembro de la superfamilia de receptores con 7DTM acoplados a proteínas G (Feighner et al., 1998, McKee et al., 1997, Smith et al., 2001). Se han aislado dos tipos de receptores distintos, GHSR-1a y GHSR-1b, siendo el segundo farmacológicamente inactivo (Kojima y Kangawa, 2005). El receptor GHSR-1a es integrante de una superfamilia de receptores que incluye otros receptores de ligandos gastrointestinales, como la neurotensina (Vincent et al., 1999), la motilina y la neuromedina U (Fujii et al., 2000, Hosoya et al., 2000, Howard et al., 2000, Kojima et al., 2000). Para la activación del receptor GHSR-1a se requiere la presencia del ácido graso acil n-octanoico, aunque algunas variantes de ghrelina carentes del ácido graso son capaces de estimular o inhibir la ingesta independientemente del receptor (Asakawa et al., 2005, Matsuda et al., 2006a, Toshinai et al., 2006). La cascada intracelular consecuente a la unión de ghrelina a su receptor se ha descrito para la estimulación de la liberación de GH producida por ghrelina, e implica la ruta de activación de fosfolipasa C, generación de IP₃ y diacilglicerol y aumento de calcio intracelular (Kojima et al., 2005).

En los mamíferos se ha encontrado expresión del receptor de ghrelina en diferentes regiones centrales, destacando distintos núcleos hipotalámicos, como el arqueado y ventromedial, y otras regiones, como el hipocampo (Guan et al., 1997, Howard et al., 1996, Nakazato et al., 2001). Numerosos lugares en la periferia también expresan receptor de ghrelina, como la hipófisis, el corazón, pulmón, hígado, riñón, páncreas, estomago,

I. INTRODUCCIÓN

intestino, tejido adiposo y células del sistema inmune (Gnanapavan et al., 2002, Guan et al., 1997, Hattori et al., 2001, Kojima et al., 2001). Esta amplia distribución de receptores sugiere una gran multiplicidad de funciones asociadas a la ghrelina (Broglia et al., 2003).

En los peces se han clasificado los receptores de ghrelina en dos tipos GHS-R1 y GHS-R2, con dos subtipos cada uno (GHS-R1a-1, GHS-R1a-2, GHS-R2a-1 y GHS-R2a-2), existiendo también el subtipo GHSR-R1a-LR, encontrado en un número limitado de especies (Kaiya et al., 2013b). Aunque la distribución de los receptores de ghrelina varía dependiendo de la especie y del subtipo de receptor, los tejidos que presentan los mayores niveles de expresión son el cerebro entero, hipotálamo, hipófisis, tracto gastrointestinal e hígado (Jonsson, 2013). En el carpín se han encontrado los dos tipos principales de receptores de ghrelina, con los 2 subtipos cada uno, de los cuales tres son funcionales mientras que el receptor GHS-R2a-2 no lo es (Kaiya et al., 2010). Además, existen diferencias de expresión entre receptores, el tipo GHS-R1a tiene mayor nivel de expresión (2-50 veces) que los GHS-R2a, y entre los subtipos 2a, el GHS-R2a-2 tiene menor nivel de expresión (1/25) que el GHS-R2a-1 (Kaiya et al. 2010). La distribución de estos receptores es amplia, con elevados niveles de expresión en los lóbulos vagales (GHS-R1a1), hígado, testículo (GHS-R1a2), diencéfalo (GHS-R2a1), y telencéfalo (GHS-R2a2) (Kaiya et al. 2010). Se ha propuesto que en la regulación del metabolismo energético por ghrelina estarían implicados los receptores del tipo 1a, cuya expresión se modifica cuando los peces son sometidos a periodos largos de ayuno (Kaya et al., 2010), mientras que en la regulación de la actividad locomotora estaría implicado el subtipo GHS-R2a1 (Yahashi et al., 2012)

1.4.3.3. Efectos biológicos

La ghrelina estimula la liberación de hormona de crecimiento (*growth hormone*, GH), regula la ingesta y el metabolismo energético (Yin et al., 2009). Estudios pioneros *in vitro* e *in vivo* utilizando ghrelina exógena confirmaron su efecto directo sobre la hipófisis y su especificidad en la estimulación de la liberación de GH (Kojima et al., 1999). En el núcleo arqueado hipotalámico, las neuronas que contienen ghrelina envían eferencias a las neuronas que expresan péptidos orexigenicos, NPY y AgRP, estimulando su liberación, y a las neuronas que expresan proopiomelanocortina inhibiendo la liberación de este péptido anorexigenico. En el núcleo paraventricular hipotalámico, las neuronas que contienen ghrelina también envían fibras a las neuronas de NPY, que a su vez inhiben la liberación de GABA, resultando en una estimulación de las neuronas que contienen hormona liberadora

I. INTRODUCCIÓN

de corticotropina (CRH), activadora del eje adrenal (Kojima et al., 2005). Como se ha mencionado anteriormente (apartado 2.2.1.), la ghrelina también interacciona con las orexinas, de modo que en la inducción de la ingesta intervienen ambos reguladores junto a otras hormonas orexigénicas, como el NPY (Toshinai et al., 2003). En los mamíferos se ha implicado a la ghrelina en otras funciones, como el establecimiento y retención de la memoria (Carlini et al., 2002, Guan et al., 1997); estimulación de la motilidad gástrica, secreción de ácido y recambio de las células de la mucosa gástrica e intestinal (Dornonville de la Cour et al., 2004, Masuda et al., 2000), además de afectar al sistema cardiovascular (van der Lely et al., 2004), inmune (Dixit et al., 2004) y reproductor (Moran et al., 2004).

En peces, así como en mamíferos, la ghrelina también es afectada por el estado nutricional, siendo que sus niveles de expresión en el cerebro e intestino aumentan en condiciones de ayuno y disminuyen después de la alimentación (Unniappan et al., 2004; Amole and Unniappan, 2009). Concordando con estos cambios, la administración de ghrelina exógena suele inducir un aumento de la ingesta en distintas especies de peces (Matsuda et al., 2006a, Miura et al., 2006, Miura et al., 2007, Riley et al., 2005, Unniappan et al., 2004, Unniappan et al., 2002, Yahashi et al., 2012), con alguna excepción como es el caso de la trucha arco-íris (Jonsson et al., 2007, Jonsson et al., 2010).

En el carpín, los primeros estudios abordados mediante administración *icv* o *ip* de las isoformas gGRL1-12 y gGRL1-19 mostraron estimulación de la ingesta a determinadas dosis (Unniapan et al., 2004; (Matsuda et al., 2006a,b), liberación de GH y gonadotropinas (Volkoff et al., 2005), además de inducir un incremento de la actividad locomotora (Matsuda et al., 2006a). En estudios posteriores la isoforma con 17 aminoácidos, considerada predominante en el carpín, presenta un efecto orexigénico similar al de las gGRL1-12 y gGRL1-19, aunque su acción estimuladora de la actividad locomotora sólo se observa tras administración *icv* pero no *ip* (Yahashi et al., 2012). En concordancia con esta acción orexigénica se han descrito aumentos de la expresión de ghrelina en el intestino y en el cerebro en condiciones de ayuno prolongado (Matsuda et al., 2006b).

Estudios recientes realizados en roedores han relacionado a la ghrelina con el sistema circadiano, proponiendo una acción de esta hormona en la señalización a nivel hipotalámico durante la FAA (van der Plasse et al., 2013), posibles interacciones con genes reloj (LeSauter et al., 2009), e incluso efectos en la actividad locomotora diaria (Yannielli et al., 2007). La ghrelina y las proteínas PER1 y PER2 se co-expresan en las células oxínticas

I. INTRODUCCIÓN

del estómago de mamíferos, y presentan un ritmo diario de expresión en condiciones de ciclos luz/oscuridad, que se anula en oscuridad constante (LeSauter et al., 2009). Algunos estudios *in vitro* también apoyan esta relación de la ghrelina con el sistema circadiano en los mamíferos, ya que la adición de ghrelina en momentos específicos del ciclo diario produce adelantos de fase de la actividad eléctrica y de la expresión de PER2::LUCIFERASA de NSQ *in vitro* (Yannielli et al., 2007), y agonistas de ghrelina intervienen en la sincronización a la luz de neuronas del NSQ (Yi et al., 2008). Hasta la fecha no existen datos que relacionen la ghrelina con el sistema circadiano en los peces.

2. TRACTO GASTROINTESTINAL

2.1. Anatomía general

El tracto gastrointestinal (TGI) de la mayoría de los vertebrados se caracteriza por mostrar una organización tubular que permite el transporte del alimento a lo largo de regiones especializadas en distintas funciones digestivas. Desde un punto de vista funcional, el TGI se puede dividir en cuatro regiones (Randall et al., 2002).

- Tracto cefálico, donde se produce la entrada del alimento, se realiza la deglución y comienza la digestión mecánica.

- Tracto anterior, formado por el esófago, cuya función es transportar el alimento desde la zona oral hasta el estómago, y el estómago, que sirve como lugar de almacenamiento y donde comienza la digestión química en la mayoría de las especies, con la secreción de ácido clorhídrico y pepsina. No obstante, algunos grupos de peces (familias *Cyprinidae*, *Catostomidae*, *Labridae*, *Scaridae*, *Odacidae* y *Blenniidae*) carecen de estómago (Horn, 1998), y en su lugar la parte más anterior del intestino se engrosa en el denominado bulbo intestinal, con funciones de almacenamiento, utilizando tripsina como enzima proteolítica más importante (Al-Hussaini, 1949, McVay y Kaan, 1940, Wallace et al., 2005).

- Tracto medio, zona principal de digestión química de proteínas, grasas y carbohidratos gracias a la secreción de enzimas digestivas. En esta región se localiza el intestino delgado, con longitud variable dependiendo del tipo de dieta. En vertebrados en general, y en los peces en particular, el intestino suele tener menor longitud en especies carnívoras (aproximadamente equiparable a la longitud corporal), y mayor en herbívoras o

I. INTRODUCCIÓN

detritívoras (en las que el intestino puede alcanzar hasta 20 veces la longitud corporal) (Horn, 1998; Randall *et al.*, 2002).

- Tracto posterior, región donde se reabsorben agua e iones y se almacenan los restos del alimento digerido hasta el momento de la defecación.

Desde un punto de vista histológico, el intestino se organiza en una serie de capas concéntricas con una disposición similar en la mayoría de los vertebrados. En general, consta de dos capas musculares, una longitudinal, más externa y de menor grosor, y otra perpendicular e interior a ésta, gruesa y densamente innervada, que constituye la capa circular (Figura 6). El grosor de ambas capas varía en función de la especie y de la región intestinal (Olsson y Holmgren, 2001, Withers, 1992). Hacia la parte más interna del músculo circular se encuentra la capa submucosa, formada por tejido conjuntivo y células secretoras, seguida de la mucosa y el epitelio de la luz o lumen intestinal. Dos plexos nerviosos se extienden en la pared intestinal, el plexo mientérico o de Auerbach, situado entre ambas capas musculares, y de naturaleza ganglionar, y el plexo submucoso o de Meissner, aganglionar, localizado en la cara externa de la submucosa próximo a la capa muscular.

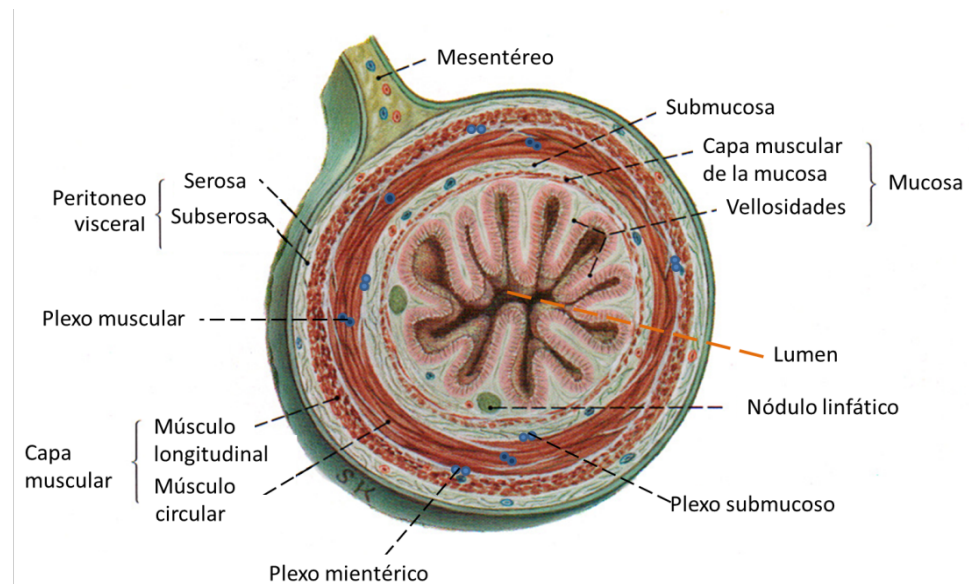


Figura 6. Sección circular del intestino de mamíferos mostrando su estructura en capas concéntricas del exterior hacia el lumen.

En ocasiones, dependiendo también de la especie y de la región intestinal, la submucosa y la mucosa están separadas entre sí por una delgada capa muscular, la *muscularis mucosae* (Figura 7). En los teleósteos el grosor de la pared intestinal es menor y

I. INTRODUCCIÓN

con menor número de plegamientos del epitelio que en los mamíferos, si bien están presentes todas las capas descritas excepto la *muscularis mucosae*. La mucosa recibe gran cantidad de inervación procedente de los plexos, además de contener células endocrinas y paracrinas implicadas en la regulación de las funciones intestinales.

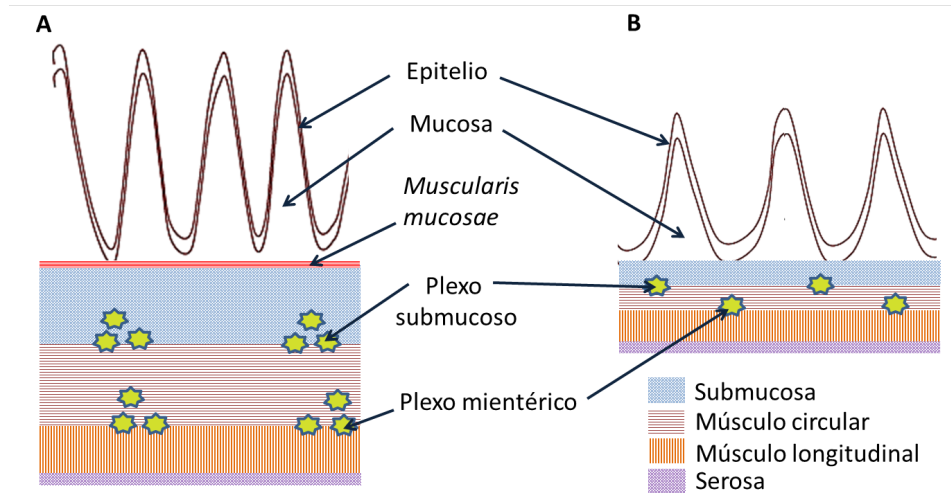


Figura 7. Representación esquemática mostrando las principales diferencias anatómicas de la pared intestinal de mamíferos (A) y teleósteos (B).

A pesar de las marcadas diferencias entre especies y regiones gastrointestinales se puede considerar, en general, que las células del músculo liso intestinal son alargadas, con núcleo central, y uniones de tipo *gap* que conectan unas con otras permitiendo su acoplamiento eléctrico (Nakamura et al., 1998). Esta particularidad de las células musculares del intestino es una característica conservada filogenéticamente, y se ha descrito en distintos vertebrados, incluyendo los peces (Halasy et al., 1988). Las células intersticiales de Cajal (ICC, *interstitial cells of Cajal*) son células mesenquimáticas localizadas principalmente en las capas musculares, que se unen a las células musculares mediante uniones estrechas de tipo *gap* (Vanderwinden, 1999), y son las responsables de originar el denominado ritmo de ondas lentas, funcionando como osciladores rítmicos de la pared intestinal (Sanders et al., 2006).

2.2. Motilidad intestinal

Se entiende por motilidad intestinal una serie de procesos integrados que incluyen actividad mioeléctrica, actividad contráctil, tono y tránsito. En general, la motilidad intestinal se genera y controla de manera local a través del sistema nervioso entérico,

I. INTRODUCCIÓN

aunque puede existir una regulación por señales procedentes del sistema nervioso central o de otras regiones del intestino (Withers, 1992, Hansen, 2003). La motilidad intestinal, tanto en mamíferos como en otros vertebrados, está controlada principalmente por tres elementos: la presencia de alimento en el tubo digestivo, la inervación autónoma y el control endocrino.

El intestino modifica sus patrones de motilidad por medio de reflejos cefálicos, simplemente ante la vista, el olor o la anticipación al alimento. Tras la ingesta, estímulos de origen central y local del tubo digestivo producidos por la presencia del alimento provocan el inicio de patrones de motilidad específicos, como el reflejo de deglución, el vaciado gástrico, o la peristalsis, necesarios tanto para el tránsito del bolo alimenticio a lo largo del tracto digestivo como para la realización de la digestión mecánica. Así, en la motilidad gastrointestinal intervienen las contracciones locales, que mezclan el alimento, y los movimientos peristálticos que lo propulsan, bien de forma anterógrada (de boca a ano) o retrógrada (vómito, regurgitación). Por otra parte, los distintos esfínteres localizados a lo largo del TGI facilitan la compartimentación del mismo mediante su contracción (Olsson y Holmgren, 2001).

En un estado interdigestivo, el patrón de motilidad se caracteriza por la aparición del complejo motor mioeléctrico (MMC, *myoelectric motor complex*) descrito inicialmente en perros (Szurszewski, 1969). Los MMC se podrían definir como agrupaciones o complejos de contracciones que se originan juntas y migran en sentido anal (Kunze y Furness, 1999), actúan facilitando el vaciado del tubo digestivo en los períodos interdigestivos, a la vez que regulan el crecimiento de la flora bacteriana y evitan el paso de las bacterias hacia la parte anterior del intestino delgado (Nieuwenhuijs et al., 1998, Vantrappen et al., 1977). En mamíferos carnívoros, la propagación de los MMC sólo ocurre en el periodo interdigestivo, mientras que en los herbívoros también tiene lugar en estados de reciente alimentación (Wingate, 1981). El conocimiento sobre la propagación de los MMC en el intestino de teleósteos es muy limitado, si bien en el bacalao se ha descrito un patrón similar al de los mamíferos (Karila y Holmgren, 1995).

En general, cuando el organismo se encuentra en un estado de digestión activa, el patrón de motilidad intestinal se caracteriza por una actividad contráctil de carácter fásico, que sirve tanto para el mezclado (movimiento pendular o segmentado) como para la propulsión (movimientos peristálticos) del alimento (Kunze y Furness, 1999; Hansen,

I. INTRODUCCIÓN

2003). La frecuencia y dirección de propagación de las contracciones fásicas están reguladas por las ondas lentas, que son cambios cíclicos en el potencial de membrana debidos a la activación e inactivación de bombas o canales iónicos. Estas ondas lentas representan un tono espontáneo de contracciones con frecuencia y amplitud variable en función de la especie, y dependientes de un tono neurógeno procedente de la innervación intestinal y de un tono miógeno característico del músculo, propio de las mencionadas ICC, aunque la naturaleza de esta actividad de ondas lentas no es del todo bien conocida (Rumessen y Thuneberg, 1996, Sanders *et al.*, 2006).

Los estudios de motilidad intestinal realizados hasta la fecha en peces teleósteos no habían detectado presencia de un ritmo de ondas lentas en la trucha arco iris (Johansson y Holmgren, 2003), pero sí en otras especies como el salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Forgan y Forster, 2007) y el pez cebra (Holmberg *et al.*, 2007). Tampoco se puede afirmar de manera concluyente la presencia de ICCs en el intestino de teleósteos, debido a la variedad de resultados publicados (Holmberg *et al.*, 2007). Los intentos de localizar la expresión de la proteína transmembrana c-kit (receptor de proteína kinasa), descrita por Maeda y colaboradores (1992) como necesaria para el funcionamiento de las ICCs en el intestino de teleósteos no produjeron inicialmente resultados positivos en el intestino de larvas de pez cebra (Mellgren y Johnson, 2005, Wallace *et al.*, 2005), pero estudios posteriores mediante técnicas de hibridación *in situ* y RT-PCR han logrado identificar los dos ortólogos de c-kit de mamíferos en el TGI de ejemplares adultos de pez cebra, observando además alteraciones del patrón de contracciones intestinales espontáneas en larvas que presentan mutaciones de estas proteínas (Rich *et al.*, 2007).

2.2.1. Regulación neural de la motilidad intestinal. Sistema nervioso entérico

Las funciones viscerales no conscientes, como la respiración, la circulación o la digestión son controladas por el sistema nervioso autónomo, en el que pueden establecerse tres subdivisiones: el simpático, el parasimpático y el sistema nervioso entérico, que constituye la innervación intrínseca del TGI y está formado por los plexos ganglionares y aganglionares mencionados anteriormente. La innervación extrínseca del intestino procede fundamentalmente del X par craneal o nervio vago (en estómago e intestino anterior), de los nervios esplácnicos (estómago e intestino) y del nervio pélvico (intestino posterior). En especies de peces sin estómago, como el carpín, el vago inerva la totalidad del intestino (Olsson, 2009). La innervación extrínseca desempeña un papel importante en la

coordinación de la motilidad intestinal y en la integración de sensaciones como apetito, saciedad o estímulos dolorosos (Wood et al., 1999). Las aferencias vagales son parasimpáticas en todos los vertebrados, aunque mayoritariamente son fibras sensitivas cuyos somas neuronales se localizan en el ganglio nodoso, y se encargan de transmitir la información desde el estómago y glándulas anejas hacia el sistema nervioso central. Los nervios espláncnicos son fundamentalmente simpáticos, mientras que el nervio pélvico envía aferencias tanto simpáticas como parasimpáticas. La innervación procedente del sistema simpático, de carácter noradrenérgico, actúa de forma inhibitoria, mientras que la innervación parasimpática, colinérgica, es excitadora, estimulando la motilidad y las secreciones gastrointestinales (Randall et al., 2002). Además, la estimulación química y mecánica de las terminaciones sensitivas de la mucosa gastrointestinal generan arcos reflejos que activan neuronas excitadoras e inhibitoras del plexo mientérico, regulando el peristaltismo tanto en mamíferos como en peces (Karila y Holmgren, 1995, Kunze y Furness, 1999).

El sistema nervioso entérico está constituido por neuronas cuyos somas se localizan dentro de la pared intestinal, mayoritariamente en el plexo mientérico, y puede funcionar con independencia del resto del sistema nervioso autónomo (Kunze y Furness, 1999). Las neuronas mientéricas inervan las capas musculares, actuando como motoneuronas e interneuronas, además de inervar a las ICCs (Kunze y Furness, 1999; Sanders et al., 2006). Las neuronas del plexo submucoso son fundamentalmente motoneuronas (Olsson y Holmgren, 2001).

2.2.2. Regulación neuroendocrina de la motilidad intestinal

El control de la motilidad intestinal es un proceso complejo en el que intervienen hormonas, neuropéptidos y neurotransmisores que pueden activar tanto receptores de terminales nerviosos como receptores de células enteroendocrinas del epitelio intestinal (Hansen, 2003). Entre los reguladores más comunes descritos tanto en mamíferos como en otros vertebrados (incluyendo los peces), está la acetilcolina (ACh), serotonina, neurocinina A, sustancia P y colecistocinina, todos ellos excitadores, y el polipéptido intestinal vasoactivo, el polipéptido activador de adenilato ciclasa hipofisiaria y el óxido nítrico, como inhibidores (Olsson, 2009, Olsson y Holmgren, 2011).

Además, también se ha estudiado en diferentes vertebrados, el efecto de otros neurotransmisores como la adrenalina/noradrenalina y la dopamina, que usualmente

I. INTRODUCCIÓN

inducen una relajación del músculo liso intestinal, así como también los efectos de péptidos como la bombesina/péptido liberador de gastrina (Olsson et al., 2011), ghrelina, motilina (Ohno et al., 2010, Olsson et al., 2008) y el neuropéptido Y (Fujimiya et al., 2000, Shahbazi et al., 2002), que generalmente estimulan la contracción del músculo liso intestinal.

La ACh es el principal neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático. Es liberada por las aferencias vagales al TGI donde ejerce su acción contráctil por estimulación de receptores muscarínicos situados en el músculo liso intestinal, o bien a través de receptores nicotínicos localizados en interneuronas de la pared intestinal (Uchiyama y Chess-Williams, 2004). En los peces, y concretamente en el carpín, se ha confirmado la presencia de ambos tipos de receptores colinérgicos, mediadores de dos tipos de respuesta excitatoria (neurógena y miógena), utilizando estímulos eléctricos en preparaciones de intestino aislado de carpín y bloqueando las repuestas con tetrodotoxina, D-tubocuranina o atropina (Ito y Kuriyama, 1971). En los peces la respuesta contráctil producida por la ACh se ha descrito en la trucha (Burnstock, 1958), la carpa (Kitazawa et al., 1990), el carpín (Velarde et al., 2009a), y el bacalao, en el que también se han descrito fibras colinérgicas que proyectan tanto anterior como posteriormente (Karila et al., 1998).

La serotonina (5HT) en los mamíferos se sintetiza y secreta principalmente en las abundantes células enterocromafines del epitelio intestinal, y en menor medida por interneuronas entéricas (Gershon y Tack, 2007). Se libera como respuesta a diversos estímulos luminales, como la distensión, la estimulación vagal, la ingestión de alimento, y presencia de ácido o de aminoácidos en el duodeno. La 5HT procedente de las células enterocromafines actúa de manera paracrina y participa en procesos secretores, sin alcanzar el sistema nervioso entérico debido tanto a su baja liposolubilidad como a su recaptura mediante un transportador específico (Hansen y Witte, 2008). No obstante también se han descrito proyecciones serotoninérgicas hacia la mucosa implicadas en la regulación de la motilidad (Beattie y Smith, 2008). En los mamíferos se ha demostrado la existencia de un elevado número de subtipos de receptores para esta indolamina, hasta catorce tipos distintos pertenecientes a siete subfamilias (Gershon y Tack, 2007). En los peces, aunque algunos subtipos de receptores serotoninérgicos han sido identificados en diferentes especies, en la actualidad se desconoce la localización precisa de dichos receptores en el intestino (Holmgren y Olsson, 2009). Al contrario de lo que sucede en los mamíferos, en el intestino de los peces las fibras serotoninérgicas parecen ser más

abundantes que las células enteroendocrinas productoras de 5HT, como se ha observado en el pez cebra (Olsson *et al.*, 2008), la trucha arco iris (Caamaño-Tubío *et al.*, 2007) o el carpín (Anderson y Campbell, 1988). En estas especies con gran cantidad de neuronas serotoninérgicas, como el pez cebra o el carpín, la liberación de 5HT se produce directamente por dichas neuronas, y no habría células enteroendocrinas productoras de 5HT (como ocurre en el intestino de los ciclóstomos) (Anderson y Campbell, 1988; Olsson *et al.*, 2008). Sin embargo, en otros teleósteos como la trucha y el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) se ha descrito una pequeña proporción de estas células (Karila *et al.*, 1998; Caamaño-Tubío *et al.*, 2007).

La 5HT en el intestino de peces estimula la contracción del músculo intestinal en especies como la trucha arco-iris (Burnstock, 1958), carpín (Kiliaan *et al.*, 1989), carpa común (Kitazawa *et al.*, 1990) o en el bacalao del Atlántico (Karila *et al.*, 1998), tratándose muy probablemente de un efecto indirecto, ya que la contracción disminuye total o parcialmente en presencia de atropina y tetrodotoxina. En otras especies, como la tilapia, la 5HT produce una relajación de la pared intestinal que no es bloqueada por tetrodotoxina, indicando una acción serotoninérgica directa sobre las propias fibras musculares.

2.3. El TGI y la organización funcional del sistema circadiano

En los últimos años se ha demostrado la presencia de osciladores en el TGI de distintos vertebrados (Hoogerwerf *et al.*, 2007, Velarde *et al.*, 2009b), capaces de sincronizarse de forma independiente de un reloj central (Sladek *et al.*, 2007, Hoogerwerf *et al.*, 2007; Feliciano *et al.*, 2011). En estos tejidos periféricos la sincronización se da principalmente por la alimentación (Stephan, 2002; (Green *et al.*, 2008) Green *et al.*, 2008), y estudios recientes han demostrado que el horario fijo de alimentación diaria es un potente sincronizador en mamíferos (Hoogerwerf *et al.*, 2007) y en peces (Feliciano *et al.*, 2011; Nisembaum *et al.*, 2012), pero también la cantidad de alimento ingerida (Kuroda *et al.*, 2012), el tipo de dieta (Barnea *et al.*, 2010, Kohsaka *et al.*, 2007) y la disponibilidad de metabolitos (Froy, 2010, Green *et al.*, 2008) pueden sincronizar osciladores del TGI.

Como se ha indicado previamente, la localización del FEO aún es incierta, pero en la actualidad, uno de los candidatos con mayor aceptación es el estómago, debido a la presencia de PER1 y PER2 en las células oxínticas gástricas, que además co-expresan con ghrelina, péptido clave en la regulación periférica de la alimentación (véase apartado

I. INTRODUCCIÓN

1.4.3.3. de esta Memoria). La expresión de ARNm de *Per1*, *Per2* y ghrelina es rítmica en presencia de un ciclo diario de luz/oscuridad, si bien en ausencia de estos genes reloj, el ritmo diario de ghrelina se anula (LeSauter et al., 2009). Estos resultados señalan al estómago como órgano clave diana de la regulación del FEO por el horario de alimentación, promoviendo un estado de alerta y anticipación a la llegada del alimento, e induciendo cambios comportamentales anticipatorios a la alimentación diaria (Konturek et al., 2011).

Se han descrito otros procesos cíclicos en el TGI, como por ejemplo la pérdida y reposición cíclicas de las células del epitelio intestinal (Barker et al., 2008), en las que también se ha encontrado expresión de genes reloj (Froy y Chapnik, 2007, Hoogerwerf et al., 2007; Sladek et al., 2007;). En este sentido, estudios recientes han mostrado interacciones entre genes reloj y elementos claves de la regulación del ciclo celular (Hunt y Sassone-Corsi, 2007, Peyric et al., 2013). Por otro lado, en mamíferos se ha observado que la proliferación rítmica de células del epitelio intestinal no es abolida por lesiones del NSQ (Scheving, 2000), habiéndose propuesto que este ritmo puede ser regulado por genes reloj del intestino, de forma altamente relacionada a un horario fijo de alimentación y/o a un ciclo de luz-oscuridad (Peyric et al., 2013).

Finalmente, algunos estudios revelan que la disrupción del funcionamiento normal de los osciladores del TGI aumenta la probabilidad de manifestación de patologías relacionadas con la alimentación, como algunos tipos de obesidad, diabetes (Konturek et al., 2011), trastornos de la motilidad intestinal (Scheving y Russell, 2007, Hoogerwerf et al., 2007), inflamaciones y cáncer (Scheving and Russell, 2007). En algunos casos, estas enfermedades llevan asociados también retrasos de fase en la regulación de la ritmicidad diaria de MEL, indicando alteraciones del sistema circadiano tanto a nivel periférico como central (Konturek et al., 2011)

En base a todos estos hallazgos, a la creciente importancia de los osciladores periféricos localizados en el TGI, que pueden ser sincronizados por osciladores centrales, pero que pueden funcionar de forma independiente, y a los recientes estudios que demuestran la participación de estos osciladores en la señalización mediada por la alimentación, consideramos de relevancia abordar estudios que profundicen en el conocimiento de su papel en la organización funcional del sistema circadiano.

3. EL CARPÍN (*Carassius auratus*)

3.1. Características generales

El carpín o carpa dorada es un teleósteo de agua dulce del Orden *Cipriniforme*, Familia *Ciprinidae*, Subfamilia *Ciprininae*, originario de China que llegó a Europa desde Japón en el siglo XVII y se cría en la actualidad como pez ornamental. Actualmente se conocen más de dos mil especies de esta familia, con amplia variedad de formas, hábitats y modos de vida (Kottelat y Freyhof, 2007).

Morfológicamente se caracterizan por tener una aleta dorsal de base amplia con espinas óseas, y una aleta anal. Originalmente tienen un color pardo amarillento o verdoso con reflejos blanco-plateados por los laterales y en el vientre. Los adultos suelen medir entre 10 y 20 cm, pero pueden llegar hasta unos 45 cm como máximo, y alcanzan la madurez sexual a partir de los 8-10 meses. Su crecimiento por lo general es rápido, aunque viene determinado por la cantidad de alimento que pueda obtener de su hábitat. Poseen huesos faríngeos inferiores, conocidos como dientes faríngeos, utilizados para triturar el alimento. Dichos dientes se localizan en el arco faríngeo y su número, forma y distribución son utilizados como carácter distintivo entre especies (Wautier et al., 2001, Stock, 2007).

Prefiere hábitats eutróficos, de aguas poco profundas en lagunas y ríos de corriente lenta, con fondos blandos y ricos en vegetación, con temperaturas suaves o frías (de 10 °C a 21 °C) y pH próximos a la neutralidad (7,0 – 7,5) (Kottelat y Freyhof, 2007). Durante el invierno permanecen casi completamente enterrados en el barro, limitando su actividad hasta la llegada de la primavera. Se adaptan con facilidad a condiciones extremas, tanto de temperatura como de oxígeno, especialmente si han sido criados bajo esas condiciones (Muus et al., 1981).



Fotografía 1. Ejemplares adultos de carpín dorado.

I. INTRODUCCIÓN

El carpín es un animal omnívoro y bentónico. En cuanto a su comportamiento alimentario, se caracteriza por nadar de forma constante buscando y persiguiendo su comida. En su hábitat natural se alimenta fundamentalmente de pequeños crustáceos, moluscos, gusanos, larvas de insectos y plantas acuáticas (Muus y Dahlström, 1981). En condiciones de laboratorio, selecciona principalmente para su dieta carbohidratos, seguido de grasas y proteínas (Sanchez-Vazquez et al., 1998) Es una especie ampliamente utilizada en investigación, ya que son fácilmente manejables y no son excesivamente exigentes en los cuidados necesarios para su mantenimiento. Además, se pueden obtener fácilmente de proveedores comerciales y muestran una rápida adaptación a las condiciones de laboratorio (Kottelat y Freyhof, 2007).

3.2. El tracto gastrointestinal

El tracto digestivo del carpín es una estructura tubular que comienza en la boca y termina en el ano, y se puede dividir en tres regiones, una porción anterior, que se inicia en el borde branquial posterior e incluye el esófago, un intestino anterior que se extiende hasta la apertura del conducto biliar, y una porción intestinal posterior, más larga y con numerosos giros intestinales que acaban en el ano (Figura 8) (Smith, 1980). La parte anterior del tubo digestivo está conectada con la musculatura de la cabeza y contiene los dientes faríngeos (cuatro filas a cada lado) unidos a los huesos faríngeos posteriores (McVay y Kaan., 1940). Al igual que la mayoría de los peces, el carpín no produce enzimas digestivas en la boca o la faringe (Kapoor et al., 1975).

La característica más notable de esta especie es la ausencia de estómago. Esófago e intestino se unen mediante el esfínter intestinal, que desemboca en el bulbo intestinal, región que no presenta diferencias histológicas con el intestino propiamente dicho, pero que se distingue de él, tanto por su mayor tamaño relativo como por el mayor grosor de las capas mucosas, lo que permite una gran expansión. En el bulbo intestinal se produce el vertido de las secreciones biliares, lo que marca el inicio de la digestión enzimática (McVay y Kaan, 1940) El intestino propiamente dicho tiene un diámetro mucho menor que el bulbo intestinal y una menor capacidad de distensión. Su gran longitud, característica de su tipo de alimentación, permite distribuir el alimento a lo largo de toda la superficie intestinal, maximizando los procesos de digestión y absorción. El intestino se encuentra enormemente plegado y está separado completamente de la vejiga natatoria, ocupando la porción ventral del cuerpo del animal (Smith, 1980). La última porción intestinal es el

I. INTRODUCCIÓN

recto, de menor grosor que el resto del tubo y sin pliegues, abriéndose al exterior a través del ano.

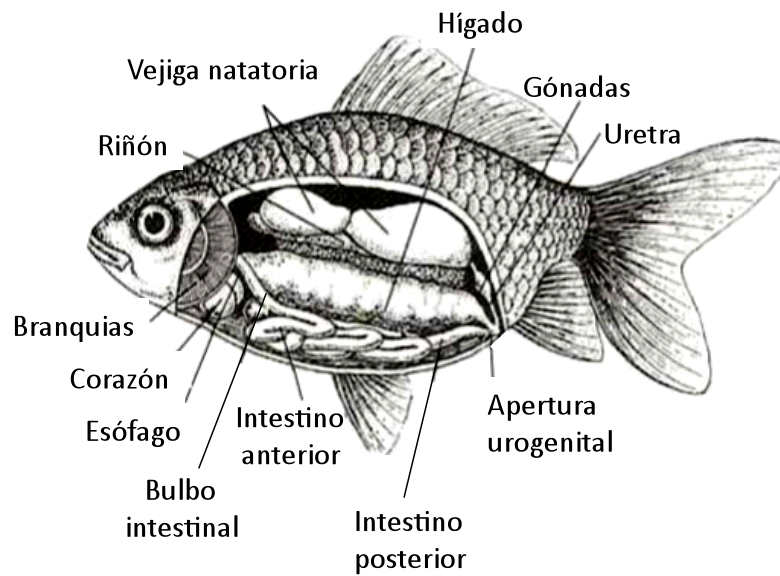


Figura 8. Representación esquemática de la anatomía interna del carpín dorado, *Carassius auratus*.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El estudio del funcionamiento del reloj circadiano ha evolucionado considerablemente en los últimos años con la clonación de genes reloj en diferentes vertebrados, permitiendo una expansión del conocimiento de su evolución funcional. La diversidad de adaptaciones mostradas por los peces y la flexibilidad de su sistema circadiano han contribuido al interés de su estudio desde distintos enfoques. En el carpín, además de conocer con detalle numerosos elementos responsables de la compleja regulación de la alimentación, como vía de señalización de entrada al funcionamiento del sistema circadiano, estudios realizados en la última década han puesto de manifiesto su utilidad como modelo para investigar el funcionamiento de dicho sistema. Conocemos la ritmicidad de expresión de genes reloj en localizaciones centrales y periféricas, y está bien caracterizada la ritmicidad de la actividad locomotora, como vía de salida funcional en la organización circadiana de este teleósteo.

La melatonina, hormona clave del sistema circadiano en los vertebrados, conocida como agente sincronizador de numerosas funciones rítmicas, ha sido objeto de estudio para numerosos equipos de investigación, que han aportado algunos resultados concluyentes y otros aún en pleno debate. En el carpín, además de su función anorexigénica e inhibidora de motilidad intestinal, se le ha adjudicado un potencial papel reductor de las respuestas al estrés y de inhibición de la actividad locomotora. La cuestión del origen gastrointestinal de la MEL en el organismo aún sigue en discusión abierta, ya que la mayoría de las pruebas a favor aportadas son de carácter indirecto. Dada la relevancia de esta hormona en el funcionamiento del sistema circadiano y el interés por conocer la posible funcionalidad del TGI en la organización circadiana justifican la investigación dirigida a la caracterización de las enzimas responsables de la síntesis de MEL en el TGI y sus posibles funciones.

Por tanto, la presente Tesis Doctoral tiene como objetivo general el estudio del funcionamiento de osciladores circadianos en el carpín, con un enfoque especial en el TGI, y en la caracterización de posibles vías de entrada y de salida de estos osciladores. Para abordar este objetivo general, nos hemos propuesto los siguientes objetivos específicos:

- ◇ Caracterización de los perfiles diarios de expresión de genes reloj (*Per1a*, *Per2a*, *Per3*, *Cry3*) en el intestino posterior del carpín, y su comparación con los perfiles en

II. OBJETIVOS

áreas centrales. Estudio del efecto sincronizador de los *zeitgebers*, ciclo diario luz/oscuridad, y horario de alimentación.

- ◇ Estudio del efecto de hormonas orexigénicas (orexina y ghrelina) como posibles vías de entrada y/o salida de osciladores periféricos (intestino anterior, intestino posterior e hígado) y centrales (hipotálamo e hipófisis) en la regulación de la expresión de genes reloj (*Per1a*, *Per2a*, *Per3*, *Cry3* y *Bmal1a*), y de la ritmicidad diaria de la actividad locomotora.
- ◇ Investigar la hipotética producción de MEL en el TGI (intestino anterior, intestino posterior e hígado) mediante el estudio de la funcionalidad de las dos enzimas finales de su ruta biosintética (AANAT y HIOMT). Caracterización enzimática de la isoforma de la AANAT funcional predominante en estas localizaciones.
- ◇ Búsqueda e identificación de funciones alternativas a la síntesis de MEL para la enzima AANAT1 en el intestino, particularizando en la regulación de la motilidad intestinal in vitro. Caracterización del mecanismo de acción de la dopamina, receptores y rutas de señalización implicadas en su acción relajante de la musculatura intestinal.

III. RESULTADOS

Capítulo I

OSCILADORES CIRCADIANOS DEL CARPÍN (*Carassius auratus*): SINCRONIZACIÓN POR FACTORES EXÓGENOS (CICLO LUZ/OSCURIDAD Y HORARIO DE ALIMENTACIÓN) Y ENDÓGENOS (OREXINA Y GHRELINA).

- 1.2 *Chronobiol Int* **2012**; 29:665-73.
- 1.3. *Peptides* **2013**; (*En prensa*).
- 1.4. *Gen Comp Endocrinol* **2014**; (*Enviado*).

1.1. OSCILADORES CIRCADIANOS DEL CARPÍN (*Carassius auratus*): SINCRONIZACIÓN POR FACTORES EXÓGENOS (CICLO LUZ/OSCURIDAD Y HORARIO DE ALIMENTACIÓN)

Resumen

Estudios recientes muestran una ritmicidad diaria de genes reloj en localizaciones periféricas, lo que ha llevado a proponer una organización circadiana de osciladores centrales y periféricos con estructura no jerarquizada en los peces. En este contexto, la primera parte de este capítulo se ha enfocado al estudio del intestino como candidato a oscilador periférico en el carpín, y a investigar la capacidad de factores ambientales (ciclo luz/oscuridad y horario de alimentación) para sincronizar la ritmicidad diaria de genes reloj, *Per1a*, *Per2a*, *Per3* y *Cry3* en este órgano. Para ello se han realizado dos diseños experimentales. Por un lado, para estudiar la posible sincronización por el ciclo luz/oscuridad (L/D) se utilizaron peces alimentados aleatoriamente (anulando el posible efecto sincronizador de un horario fijo de alimentación) y mantenidos en cuatro condiciones de iluminación, fotoperiodos 12L:12D y 12D:12L, exposición a luz constante (24L) y a oscuridad constante (24D). De forma complementaria, para estudiar el efecto del horario de alimentación en la ritmicidad de la expresión de genes reloj, los peces aclimatados a 24L (anulando el efecto sincronizador del ciclo L/D) se mantuvieron en las siguientes condiciones de alimentación: horario fijo a las 10:00h (SF10), o a las 22:00h (SF22), y alimentación aleatoria. Con el fin de averiguar si el horario de la última alimentación puede reajustar la sincronización de los genes reloj en el intestino, un grupo de animales recibió alimentación fija a las 10:00h durante todo el periodo de aclimatación, excepto el último día antes del sacrificio en el que se alimentaron a las 22:00h. En todos los experimentos los animales se sacrifican a lo largo de un ciclo completo de 24 h en intervalos de 6 horas, y la expresión de los genes reloj en el intestino del carpín se cuantifica utilizando PCR cuantitativa a tiempo real. En la Figura 9 se muestra un resumen de los experimentos realizados junto a los principales resultados obtenidos.

III. RESULTADOS

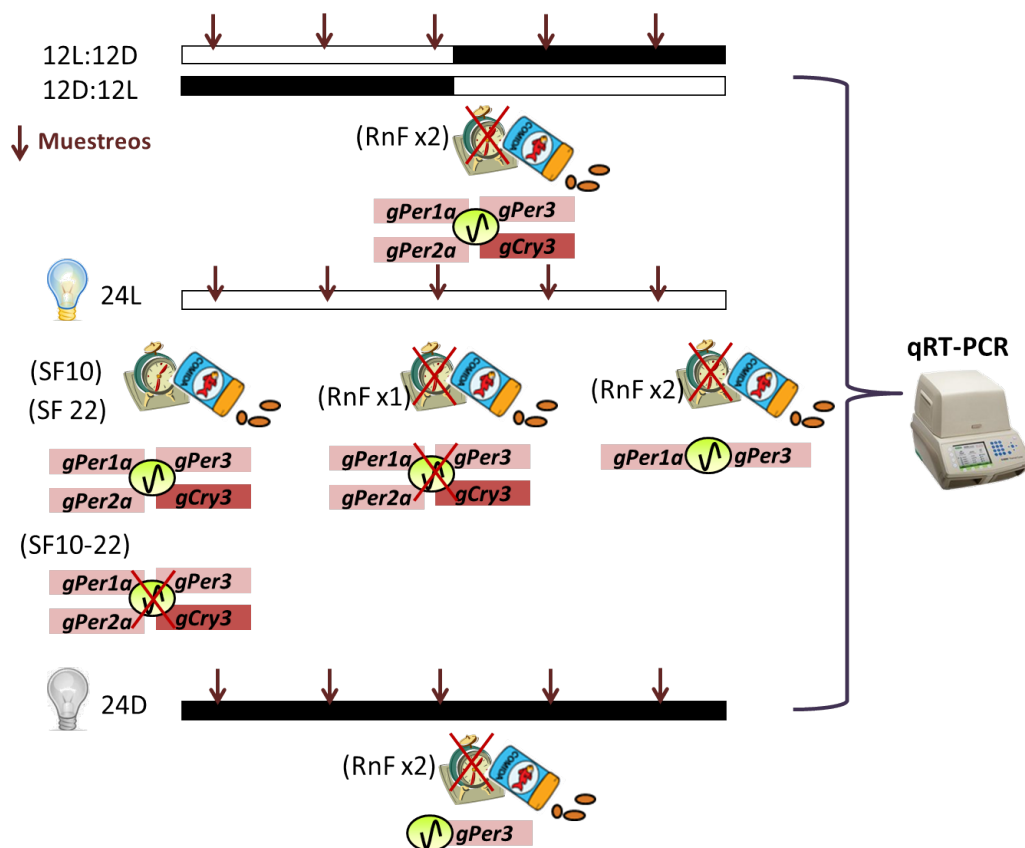


Fig. 9. Diseños experimental y principales resultados. Las flechas indican el horario de muestreo. RnF: alimentación aleatoria, SF10 y SF22: horario fijo de alimentación a las 10 y a las 22 h, respectivamente.

Los genes *gPer1a*, *gPer2a* y *gCry3* en el intestino del carpín se sincronizan a ambos *zeitgebers* (régimen fotoperiódico y horario de alimentación), anticipando tanto la hora de encendido de la luz, como la hora de llegada del alimento, siempre que estos factores aparezcan de forma cíclica. En ausencia de ambos *zeitgebers* se pierde la ritmicidad de *gCry3* y *gPer2a*, sin embargo, el ritmo de *gPer1a* se mantiene en condiciones de luz constante (24L) y alimentación aleatoria. Estos resultados indican que una alimentación aleatoria puede reajustar un componente del reloj intestinal, dependiendo de otros factores, como las condiciones energéticas o metabólicas del pez. No encontramos activación de la expresión del gen *gPer2a* en el intestino posterior del carpín durante las fases lumínicas de ambos fotoperiodos (12L:12D y 12D:12L), lo que indica que este candidato a oscilador periférico no tiene capacidad de recepción directa de la luz. La expresión del gen *gPer3*, a diferencia de los otros genes reloj estudiados, parece depender principalmente de la hora en que el alimento está disponible por última vez, independientemente de la presencia o no de un régimen fotoperiódico. Además, *gPer3* es el único de los genes reloj estudiados que conserva el ritmo diario de expresión en ausencia

de fotoperiodo, tanto en condiciones de luz como de oscuridad constantes, aunque con amplitudes más reducidas en comparación a las observadas bajo un fotoperiodo L/D. De estos resultados se deduce que la acrofase del ritmo de expresión de *gPer3* depende principalmente del horario de alimentación, si bien existe una interacción de ambos *zeitgebers* en la regulación de su expresión rítmica.

En conclusión, los resultados presentados en esta sección 1.1 indican que el intestino posterior del carpín puede sincronizarse *in vivo* por el fotoperiodo y por la hora de la alimentación, siendo el horario de alimentación un potente factor exógeno sincronizador de relojes periféricos en este teleósteo. Además, nuestros resultados revelan que ambos factores ambientales parecen actuar sobre diferentes elementos de la maquinaria molecular que constituye el oscilador intestinal en este teleósteo.

1.1.1. OSCILADORES CIRCADIANOS DEL CARPÍN (*Carassius auratus*): SINCRONIZACIÓN POR FACTORES ENDÓGENOS (OREXINA Y GHRELINA).

Resumen

En los mamíferos se ha sugerido una posible relación entre el funcionamiento del sistema circadiano y algunos reguladores endógenos del comportamiento alimentario, no existiendo ninguna información relativa a esta interesante cuestión en los peces. En esta segunda parte del capítulo I de resultados se incluyen los estudios realizados para investigar el posible papel de dos hormonas orexigénicas, orexina y ghrelina, en la funcionalidad del sistema circadiano del carpín.

En los diseños experimentales realizados los peces se aclimataron a condiciones fotoperiódicas de 12L:12D y eran alimentados diariamente en horario fijo (10:00 h, ZT2). La orexina (2.8pmol/g pc) se administró por vía ICV y la ghrelina (gGRL_[1-19]) (44pmol/g pc) y el antagonista de receptores de ghrelina ([D-Lys³]-GHRP-6, 100 pmol/g pc) por vía IP. Transcurridas 1 y 3h post-inyección (ZT7 y ZT9) se muestrearon tejidos centrales y periféricos en los que se cuantificó la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real de NPY y orexina hipotalámicos en los peces tratados con ghrelina, y de ghrelina en el intestino anterior de los peces inyectados con orexina. En ambos estudios se cuantificó la expresión de genes reloj en el hipotálamo, intestino anterior, intestino posterior e hígado, y se obtuvieron registros diarios de actividad locomotora y FAA.

III. RESULTADOS

En la Figura 10 se muestra un resumen esquemático de los diseños experimentales realizados y los principales resultados obtenidos en estos estudios. La orexina incrementa, como se esperaba, la expresión de NPY en el hipotálamo, y también (por primera vez en peces) la expresión de ghrelina en el intestino anterior. A su vez, el tratamiento con ghrelina induce la expresión de orexina hipotalámica a las 3h de su administración. Estos resultados muestran una interacción clave entre reguladores de la alimentación, centrales (orexina hipotalámica y NPY) y periféricos (ghrelina intestinal). En relación con los efectos de estas hormonas sobre la expresión de genes reloj encontramos que orexina induce expresión de los genes *Per* en el hipotálamo e intestino anterior a las 3h de la inyección, y de forma similar la ghrelina aumenta la expresión de los genes *Per* en el hipotálamo y en el hígado, efecto que se contrarresta con el pre tratamiento con su antagonista. En ninguno de los dos casos se modifica la expresión del gen del bucle positivo analizado, el *gBmal1a*. Estos resultados muestran por primera vez en los peces una interacción entre hormonas orexigénicas y la base molecular del funcionamiento de osciladores circadianos (centrales y periféricos) en peces, sugiriendo una posible función en la señalización de entrada al sistema circadiano.

A fin de investigar posibles acciones de estas hormonas en la sincronización de una señal inequívoca de salida del sistema circadiano, como es la ritmicidad locomotora diaria y la FAA, se han realizado varios diseños experimentales en los que orexina o ghrelina se administran de modo subcrónico en distintas condiciones ambientales. En el tratamiento con orexina se utilizaron varias aproximaciones, combinando los *zeitgebers*, ciclo L/D y horario de alimentación, y en todos los casos la administración icv se realizó de forma subcrónica (4-8 inyecciones) durante la fase luminosa del fotociclo. La orexina sincroniza la actividad locomotora diaria en ausencia de ambos *zeitgeber*, fotoperiodo (24L) y alimentación (ayuno), lo que pone de manifiesto por primera vez en los peces que este péptido puede actuar como señal de entrada al sistema circadiano. En el caso de la ghrelina, los estudios realizados para analizar su efecto sobre la actividad locomotora se han llevado a cabo en peces mantenidos en presencia de fotociclo (12L:12D) y condiciones de ayuno, y en peces alimentados 3 horas después de la inyección. El tratamiento con ghrelina o su antagonista se prolongó durante 5-10 días). En estas condiciones experimentales la ghrelina no ha sido capaz de sincronizar la actividad locomotora diaria de los peces, sin embargo la inyección del antagonista de receptores de ghrelina inhibe significativamente el establecimiento de la FAA en los animales alimentados a un horario fijo. Por tanto, aunque

III. RESULTADOS

la ghrelina en principio no parece regular la actividad locomotora general del carpín, si parece estar implicada en la generación de la FAA, por lo que podría intervenir en la señalización de salidas del FEO.

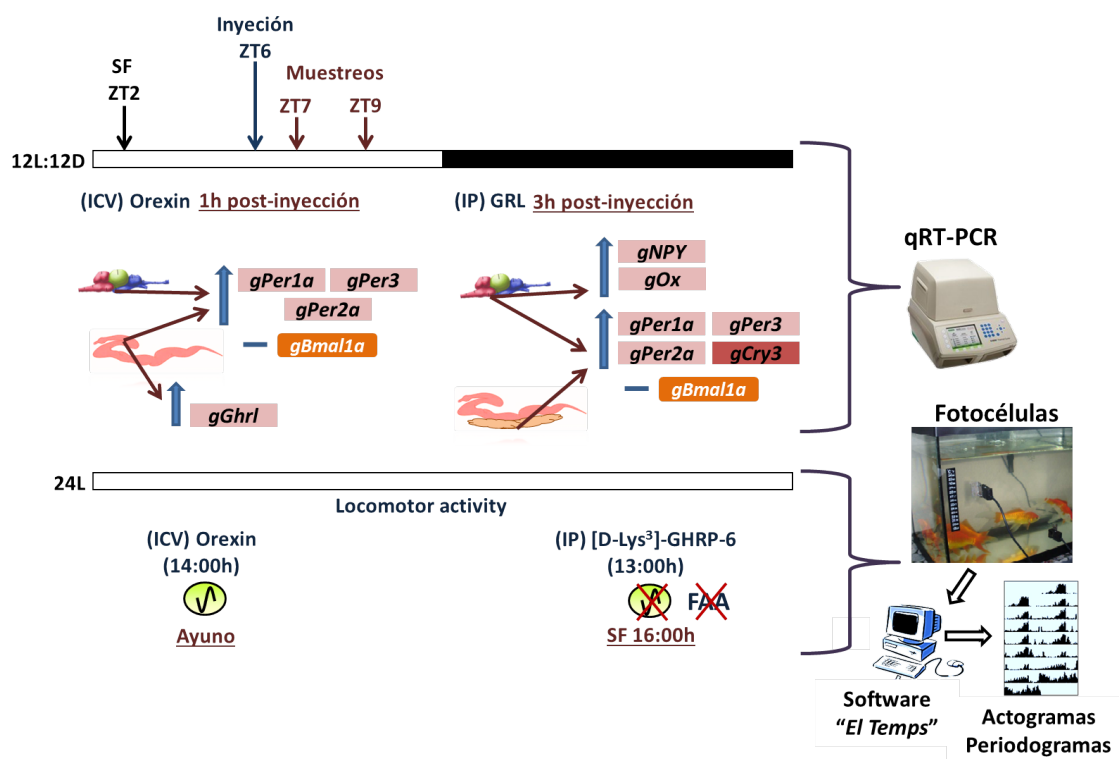


Fig. 10. Esquema de los diseños experimentales y principales resultados del apartado I.2. de Resultados.

III. RESULTADOS

Light-dark cycle and feeding time differentially entrains the gut molecular clock of the goldfish (*Carassius auratus*).

Laura G. Nisembaum, Elena Velarde, Ana B. Tinoco, Clara Azpeleta, Nuria de Pedro, Angel L. Alonso-Gómez, María J. Delgado, and Esther Isorna*

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

The aim of the present study was to investigate how photocycle and feeding-time cues regulate the daily expression of *Per1a*, *Per2a*, *Per3*, and *Cry3* in the goldfish hindgut. For this purpose, we studied the daily rhythmicity of these genes in fish maintained under different lighting conditions and under different feeding regimes (scheduled or not). We also studied whether the timing of just one meal is able to reset the hindgut molecular clock. In a first experiment, randomly fed fish were divided into four groups and kept under different light conditions for 30 d: 12 h light and 12 h dark (12L:12D), an inverted photoperiod (12D:12L), constant darkness (24D), and constant light (24L). In a second study, fish maintained under 24L were divided into four groups fed at different time points for 35 d: (1) fish scheduled-fed once a day (at 10:00 h); (2) fish fed with a 12-h shifted schedule (at 22:00 h); (3) fish fed at 10:00 h throughout the experiment, except the last day when fed at 22:00 h; and (4) a randomly fed group of fish. Fish were sacrificed every 6 h throughout a 24-h cycle. In both experiments, *gPer1a*, *gPer2a*, *gPer3*, and *gCry3* transcripts were quantified using Real Time-qPCR in the hindgut. Results show the clock genes *gPer1a*, *gPer2a*, and *gCry3* are synchronized by both zeitgebers, the photocycle and feeding regime, in goldfish hindgut. Moreover, such clock genes anticipate light-on and food delivery, when these cues appear in a cyclic manner. In the absence of both zeitgebers, *gCry3* and *gPer2a* rhythmicity disappeared. In contrast, the *gPer1* rhythm was maintained under 24L and random feeding conditions, but not always, suggesting that food when randomly supplied is able to reset the clock depending on other factors, such as the energetic and metabolic conditions of the fish. The expression of *gPer2a* was not activated during the light phase of the cycle, suggesting the hindgut of goldfish is a non-direct photosensitive organ. In contrast to the other three genes, *gPer3* expression in the goldfish hindgut seemed to be dependent on the timing of the last food delivery, even in the presence of a photocycle. This gene was the only one that maintained daily rhythms under both constant lighting conditions (24D and 24L), although with lower amplitude than when a photocycle was present. This indicates that, although the acrophase (peak time) of the *gPer3* expression rhythm seems to be driven by feeding time, there is an interaction of both zeitgebers, food and light, to regulate its expression. In conclusion, present data indicate: (1) the hindgut of goldfish can be synchronized in vivo by both the photocycle and feeding time; (2) food is a potent signal that entrains this peripheral oscillator; and (3) both environmental cues seems to target different elements of the molecular clock. (Author correspondence: eisornaa@bio.ucm.es)

Keywords: Clock genes, Food, Food entrainable oscillator, Hindgut, Peripheral oscillator

INTRODUCTION

The circadian system is based on endogenous clocks located in central and peripheral organs that can be synchronized by environmental time cues (Hastings et al., 2007; Panda et al., 2002). The most studied oscillators are light entrainable oscillators (LEOs), although biological clocks can also be synchronized by non-photocycle cues, such as food availability (Hastings et al., 2007; Stephan, 2002). These clocks are known as food entrainable oscillators (FEOs; Mistlberger, 2011; Stephan, 2002).

The organization of the circadian system varies among vertebrates, being more hierarchical in mammals (Hastings et al., 2007) than in fish, where a “master clock” has not yet been clearly identified (Cahill, 2002; Feliciano et al., 2011; Noche et al., 2011). However, the molecular machinery of the endogenous oscillators is highly conserved through phylogeny, and it is based on two transcriptional-translational loops of a set of genes called “clock genes”, which oscillate with a periodicity close to

Submitted November 24, 2011, Returned for revision January 4, 2012, Accepted March 30, 2012

*Address correspondence to Esther Isorna, Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid. C/ José Antonio Nováis 2, 28040 Madrid, Spain. Phone: +34 913944984/Fax: +34 913944935, E-mail: eisornaa@bio.ucm.es

III. RESULTADOS

666 L. G. Nisembaum et al.

24 h (Hastings et al., 2007; Panda et al., 2002). The negative loop of the core clock is formed by the cryptochrome (*Cry*) and period (*Per*) genes, which suppress the expression of the positive elements, *Clock* and *Bmal-1*, (Hastings et al., 2007; Panda et al., 2002). Although this model of clock functioning is very well conserved, a larger number of clock genes have been found in fish compared to mammals, due to early duplication of the teleost genome (Cahill, 2002; Vatine et al., 2011).

Knowledge of the circadian oscillators and clock-genes rhythms in fish is scarce, with the exception of the zebrafish (*Danio rerio*). In this species, all tissues and cells are directly light-responsive (Whitmore et al., 2000), and it has been mostly used to investigate how light entrains the clock (Cahill, 2002; Pando et al., 2001; Vatine et al., 2011). It has been shown that *zfPer1* expression is clock-controlled, while *zfPer2* is mainly a light-driven gene, suggesting it is a key element for the synchronization of the clock to the light-dark (LD) cycle (Pando et al., 2001; Vatine et al., 2011). The expression of *zfPer3* also seems to be clock-regulated, although it is the only *Per* gene that maintains its rhythmicity in vivo under constant light (24L) in both central and peripheral tissues (Kaneko et al., 2006). The role of *zfCry3* remains unclear and does not repress *Clock-Bmal* expression as *zfCry1* and *zfCry2* do (Vatine et al., 2011).

Photoreception in peripheral locations in other fish species has not been demonstrated to date, and, thus, the mechanism by which peripheral oscillators may be synchronized remains unclear. Daily rhythms in some clock genes linked to the lighting conditions in the liver have been described in a few fish species, such as golden rabbit fish, *Siganus guttatus*, (Park et al., 2007), goldfish, *Carassius auratus* (Feliciano et al., 2011; Velarde et al., 2009), and Atlantic salmon, *Salmo salar* (Huang et al., 2010). Daily rhythmic expression of *Per* and *Cry* genes in the gut has been only reported in goldfish maintained under a LD cycle and scheduled feeding (Velarde et al., 2009). However, it is unknown if such rhythms are light- or feeding time-dependent.

Little knowledge exists about the effect of feeding time as a synchronizer of molecular oscillators in fish. In zebrafish kept under a LD cycle or 24L conditions, feeding time did not synchronize *zfPer1* expression in the whole brain, although its expression in the liver was influenced. However, under constant darkness (24D), this gene was synchronized in brain, heart, and fin tissue (Cavallari et al., 2011; López-Olmeda et al., 2010). The study by Cavallari et al. (2011) also showed that *Per1* expression in brain, heart, and fin tissue of the cavefish, *Phreatichthys andruzzii*, is entrained by a scheduled-feeding protocol. Feeding time synchronizes *Per* and/or *Cry* expression in goldfish optic tectum, hypothalamus, and liver, at least under 24L, and it has been suggested that the timing of just a single meal can reset the hepatic clock (Feliciano et al., 2011). Nevertheless, it remains unknown if clock-gene expression in the gut is entrained

by the LD cycle or feeding cues, and if it can be influenced by just the time of the last meal.

The goldfish is a good model to study such a link, because it exhibits strong activity patterns that can be synchronized by both photoperiod and feeding time (López-Olmeda & Sánchez-Vázquez, 2010; Sánchez-Vázquez et al., 1997), and it presents daily (24-h) rhythms of clock-genes expression in central and peripheral locations (Feliciano et al., 2011; Velarde et al., 2009). The aim of the present study was to investigate if LD cycle and feeding time cues are able to entrain the hindgut clock in goldfish. To this end, different clock genes were selected for study: a classical clock-controlled gene, *Per1a* (Pando et al., 2001; Vatine et al., 2011); a light-dependent gene, *Per2a* (Pando et al., 2001; Vatine et al., 2009, 2011; Velarde et al., 2009); and two less-known clock genes, *Per3* and *Cry3*, that have been related with feeding synchronization in this species (Feliciano et al., 2011). First, we studied the daily rhythmicity of these genes under different lighting conditions and feeding regimes (scheduled or not), and, second, we investigated if just one meal is able to reset the hindgut molecular clock.

MATERIALS AND METHODS

Animals and housing

Juvenile goldfish (*Carassius auratus*; 5–10 g body weight, bw) were purchased from a local supplier and kept in aerated, filtered water 60-L tanks (n = 10 fish/tank) in a temperature-controlled room (22 ± 1°C). Fish were maintained under a 12L:12D photocycle (lights-on at 08:00 h) and fed once a day at 10:00 h with a commercial diet (2% bw; Sera Biogran, Heidelberg, Germany), for at least 2 wks before experimentation. All experimental protocols were approved by the Animal Experimentation Committee of Complutense University of Madrid, comply with the Spanish current legislation on the use of laboratory animals (RD 1201/2005), and conform to international ethical standards as outlined by Portaluppi et al. (2010).

Experimental designs

Effect of lighting conditions on clock genes expression in the hindgut

Goldfish were distributed into four experimental groups (n = 30 fish/group) under the following daily LD conditions for 30 d (Figure 1A): 12L:12D (lights-on at 08:00 h); 12D:12L (lights-on at 20:00 h); 24D (constant darkness); and 24L (constant light). In order to eliminate the feeding time as a synchronizer, fish were randomly fed a commercial diet (1.5% bw) twice a day (once each 12 h at random times, giving fasting-eating intervals of 12 to 24 h). Random feeding times were provided by random number generator software (RAND function of Microsoft Excel). The day before sampling, fish ate at 10:00 h (Figure 1A). Then, 24-h fasted fish from every group were anesthetized in ice water and sacrificed by decapitation every 6 h during a 24-h cycle (n = 6 fish/

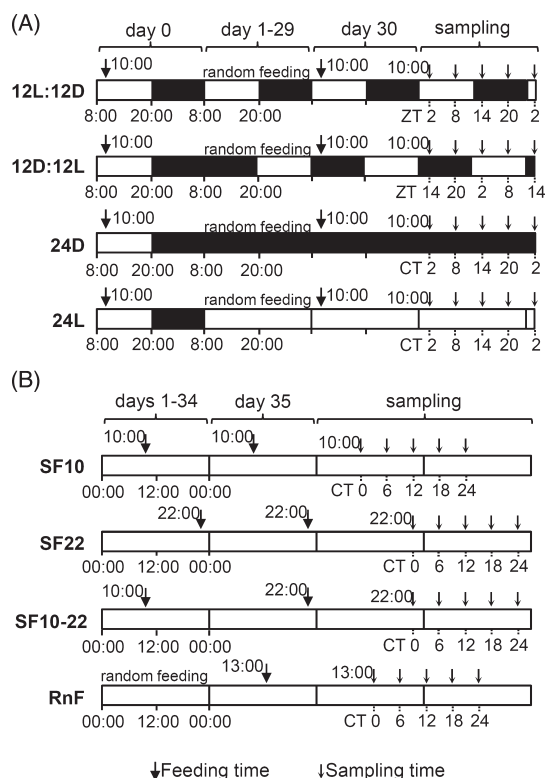


FIGURE 1. Experimental designs to study the effect of lighting conditions (A) and feeding time (B) on clock genes expression in the hindgut of goldfish. The schemes represent the experimental groups and conditions described in the Material and Methods section. The white and black bars indicate light and dark conditions, respectively. SF: scheduled feeding, RnF: random feeding.

sampling point) beginning at Zeitgeber Time or Circadian Time 2 (ZT 2 or CT 2; Figure 1A). Hindguts (the posterior half of the guts) were rapidly removed, immersed in TRI Reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA), and frozen in dry ice. All samples were stored at -80°C until used.

Effect of feeding schedule on clock genes expression in the hindgut

Goldfish maintained under continuous light were divided into four experimental groups ($n = 30$ fish/group) and fed (1.5% bw) at different times (Figure 1B). Two groups of fish were scheduled-fed at 10:00 h (SF10) or 22:00 h (SF22). A third group was scheduled-fed at 10:00 h throughout the experiment, except the last day when animals were fed at 22:00 h (SF10-22) in order to differentiate the synchronizing effect of scheduled feeding from the acute effect induced by the last feeding time. A fourth group of fish was exposed to a random feeding regime (RnF). These fish received every 24 h the same feeding ratio as the scheduled-fed animals, but at random times determined by random generator software (RAND function of Microsoft Excel). After 35 d under such

experimental conditions, fish were fasted for 1 d and sacrificed every 6 h throughout a 24-h cycle (6 fish/sampling point) at the following circadian times: CT 0, CT 6, CT 12, CT 18, and CT 24 (Figure 1B). CT 0 was defined as the time of the last food delivery, which was 24-h before the beginning of sampling in all groups (10:00 h for the SF10, 22:00 h for the SF22 and the SF10-22, and 13:00 h for the RnF; Figure 1B). Hindguts were rapidly removed, immersed in TRI Reagent (Sigma), and frozen in dry ice. All samples were stored at -80°C until used.

Quantitative Real Time PCR analysis

The expression of goldfish clock genes (*gPer1a*, *gPer2a*, *gPer3*, and *gCry3*) in the hindgut was quantified by qRT-PCR, using the abundance of goldfish 18S rRNA as a reference gene. Hindguts were homogenized in TRI Reagent (Sigma); total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions, and then treated with DNase (1 h, 37°C ; Promega, Madison, WI, USA). The integrity of the obtained RNA was analyzed on a 1% agarose denaturing electrophoresis gel. Then, 1.5 μg of DNase treated RNA was retro-transcribed with random primers and SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Real-time gene expression analyses were performed in a CFX96[™] Real-Time System (Biorad Laboratories, CA, USA). PCR reactions were developed in a 20 μl volume using 0.1 μl of cDNA for 18S, and 1 μl for the rest of the genes, iTaq[™] SYBR Green Supermix (Biorad), and specific primers (0.4 μM , Sigma; Table 1). Calibration curves were generated with serial dilutions of cDNA; all curves exhibited slopes close to -3.32 , and efficiencies were $\approx 100\%$. The PCR conditions were 3 min at 95°C , and 40 cycles: 10 s at 95°C , 30 s at 58°C , and 45 s at 72°C . All samples were analyzed in duplicate. The $\Delta\Delta\text{Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001) was used to determine the relative mRNA expression (fold change).

Data analysis

Statistical differences in clock-gene expression among the different sampling times were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc (Student Newman Keuls, SNK) test using Statgraphics software (StatPoint Technologies, Warrenton, VA). When necessary, values were transformed (logarithmic or square root transformation) to obtain a normal distribution and homogeneity of variances. Differences were considered significant when $p < .05$.

Daily (24-h) rhythms in clock gene expression were determined by fitting the data to a sinusoidal function by the least squares method described by Duggleby (1981). The formula used was $f(t) = M + A \cos(\pi/12 - \phi)$, where $f(t)$ is the gene expression level at a given time, mesor (M) is the mean value, A is the sinusoidal amplitude of oscillation, t is time in hours, and ϕ is the acrophase (time of peak expression). Non-linear regression allows the estimation of M , A , and ϕ , and their standard error (SE), the SE being based on the residual sum of squares in the least-squares fit (Delgado et al., 1993;

III. RESULTADOS

668 L. G. Nisembaum et al.

TABLE 1. Accession numbers of the genes and primers sequences employed in quantitative qRT-PCR studies.

Target gene	Accession number		Primer sequences 5' → 3'	product (pb)
<i>gPer1a</i>	EF690698	Forward	AGCGCCACTTCCTCCTCTGA	130
		Reverse	TGAAGACCTGCTGTCCGTTGG	
<i>gPer2a</i>	EF690697	Forward	TTTGTCAATCCCTGGAGCCGC	116
		Reverse	AAGGATTTCCTCAGCCACG	
<i>gPer3</i>	EF690699	Forward	GGCTATGGCAGTCTGGCTAGTAA	130
		Reverse	CAGCACAAAACCGCTGCAATGTC	
<i>gCry3</i>	EF690702	Forward	GGTGAGACAGAAGCCCTGGAA	102
		Reverse	GCTTGCGAACAGTGATTGAGCG	
18S rRNA	EF189737	Forward	ATGATTAAGAGGGACGGCCGG	143
		Reverse	TGATCGTCTTCAACCTCCGAC	

Duggleby, 1981). To test the significance of rhythm detection, we used the zero-amplitude test, which indicates if the sinusoidal amplitude differs from 0 with a given probability (Koukkari & Sothorn, 2006). The time series data were considered to display a 24-h rhythm when by ANOVA $p < .05$ and by the zero-amplitude test with cosinor analysis $p < .005$.

RESULTS

Hindgut clock genes expression under different lighting conditions

The four studied clock genes (*gPer1a*, *gPer2a*, *gPer3*, and *gCry3*) presented statistically significant 24-h rhythms, both by ANOVA and cosinor analysis, in the hindgut of goldfish maintained under a daily light-dark cycle (12L:12D and 12D:12L groups) as shown in Figure 2. The amplitudes of the rhythms of the four studied genes exhibited a 7 to 22-fold change in these two groups (Figures 2 & 4). Expression rhythms of *gPer1a*, *gPer2a*, and *gCry3* seemed to be determined by the LD cycle, because their acrophases occurred at a similar ZT in the two experimental groups with opposite daily LD cycles (Figures 2 & 4 and Table 2). Moreover, it seemed that these three clock genes anticipated light-onset, because their expression levels peaked around ZT 18-20 (*gPer1a*, *gCry3*, and *gPer2a*; Figures 2 & 4 and Table 2). In contrast, the daily rhythm found in *gPer3* expression is not apparently driven by the LD cycle, because a difference of 12h was exhibited between the acrophases (in terms of ZT) in the two experimental groups, 12L:12D and 12D:12L (Table 2). We wish to point out, however, the acrophases of the two groups coincided and occurred at the same clock time, i.e., 13:00-15:00 h (Figure 4, Table 2).

When goldfish were subjected to constant lighting conditions (24L or 24D) for 30 d, the daily rhythms in *gPer2a* and *gCry3* were lost, exhibiting no variation in the expression of these genes among the different sampling times (Figure 2). The expression of *gPer1a* preserved its daily rhythm in the hindgut under 24L, with an amplitude similar to that found in the 12L:12D and 12D:12L groups (Figure 2). No daily variations were observed in the expression of *gPer1a* after 30 d under constant darkness (24D; Figure 2). In contrast, *gPer3*

was the only gene that continued to express the daily rhythm in the hindgut under both constant lighting conditions (24L and 24D), although the amplitudes were one order of magnitude lower than in the LD-cycle groups (Figure. 2, Table 2). The acrophase of the *gPer3* time pattern under 24D conditions (CT 4.6 ± 0.8) was similar to the one observed under 12L:12D (ZT 7 ± 0.8), but it occurred \sim CT 23 in the hindgut of fish under 24L (Figure 4, Table 2). These results indicate the amplitude (but not the phase) of the rhythmic *gPer3* expression depends on lighting conditions.

Hindgut clock-genes expression under different feeding regimes

Figure 3 summarizes the results obtained under the different feeding regimes. The four studied clock genes presented significant daily variation in their expression in the hindgut of scheduled-fed goldfish (SF10 and SF22). In the SF10 group, all of the studied clock genes exhibited significant 24-h rhythmicity. The expression profiles of the four genes in the SF22 group showed daily significant differences by ANOVA among the sampling points, although significant daily rhythms were only found for *gPer1a*, *gPer3*, and *gCry3* expression (Figure 3).

The maximal expression values of the four genes occurred at similar CTs in both SF10 and SF22 animals, suggesting that feeding time is able to entrain the expression of *gPer1a*, *gPer2a*, *gPer3*, and *gCry3* in the goldfish hindgut, at least in the absence of a LD synchronizer (24L, Figures 3 & 4). Maximal expression was observed \sim CT 19-21 for *gPer1a* and *gCry3*, and \sim CT 0-1.5 for *gPer2a* and *gPer3*, i.e., the expression of the four analyzed genes peaked close to the expected meal time in both SF10 and SF22 groups (Figure 4, Table 2). The highest amplitude was found for the *gPer1a* expression rhythm in the SF10 and SF22 animals, even higher than the one observed under the presence of a 12 L:12 D photoperiod (Table 2). The amplitude of *gPer3* in the SF10 and SF22 groups was similar to that of groups exposed to a photoperiodic regime (Figure 4, Table 2), while the amplitude of *gCry3* was one order of magnitude lower.

Finally, neither in the SF10-22 nor RnF animals did any clock gene exhibit daily variations (Figure 3),

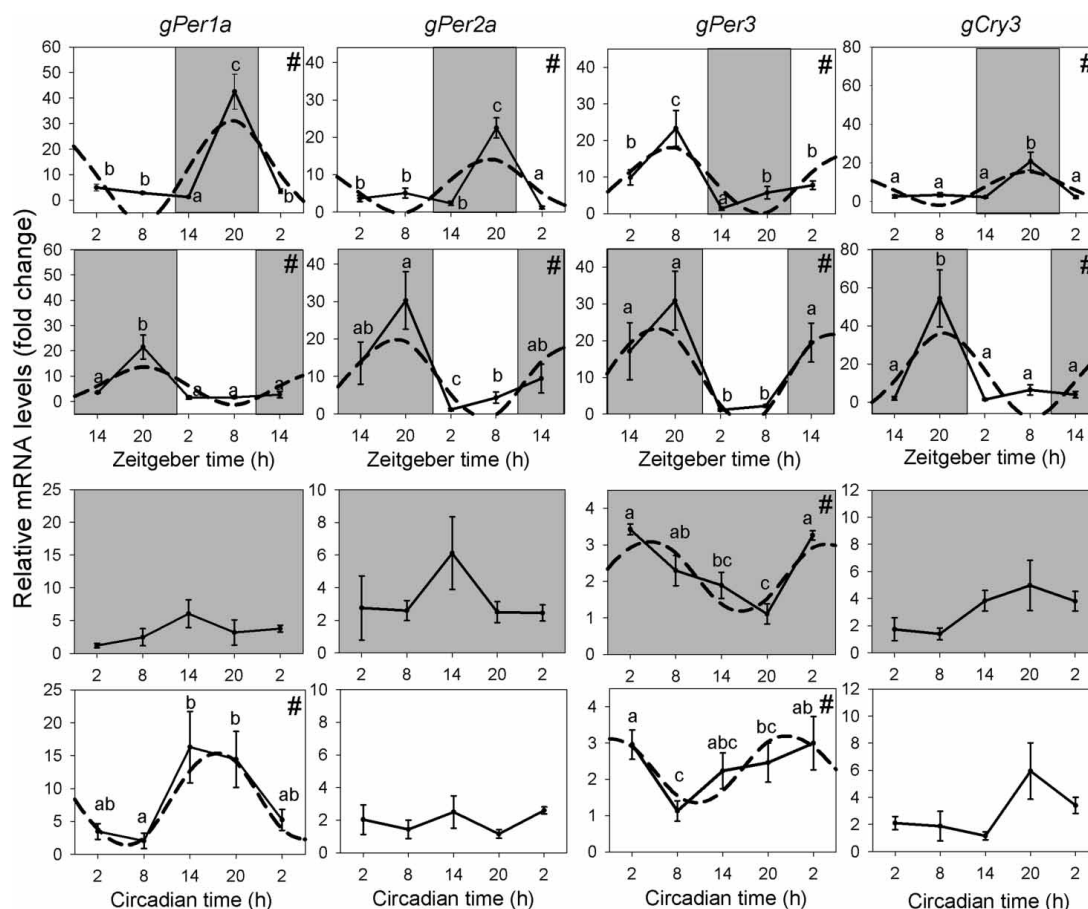


FIGURE 2. Daily profiles of clock-genes expression (from the left to the right *gPer1a*, *gPer2a*, *gPer3*, and *gCry3*) in the hindgut of goldfish maintained under different lighting conditions and randomly fed. In the absence of LD cycle, CT 0 was defined by the last time that light switched on. White and grey colors indicate light and dark conditions, respectively. Data obtained by qRT-PCR are shown as the mean \pm SEM ($n = 6$) in relative units ($\Delta\Delta Ct$ method). When significant (ANOVA, $p < .05$), differences among groups (SNK test) are indicated by different letters. Dashed line represents the periodic sinusoidal functions ($\#$, $p < .005$).

indicating that in the absence of a scheduled feeding regime these fish were unable to synchronize the rhythmic expression of the studied clock genes (Figure 1). In addition, the data also showed (Figure 3) that the daily rhythmic expression profiles of the four clock genes were lost just by delaying the last meal time (SF10-22).

DISCUSSION

The present data reveal the existence of an oscillator in the hindgut of goldfish that could be synchronized *in vivo* by both zeitgebers, LD cycle and feeding time. Data also showed that these two synchronizers do not act on the hindgut molecular clock in the same way. While *gPer1a*, *gPer2a*, and *gCry3* can be synchronized by both the LD cycle and feeding time, surprisingly, *gPer3* rhythmic expression seems to be driven mainly by feeding time.

The light-dark cycle drives *gPer1a*, *gPer2a*, and *gCry3* expression in the hindgut

When goldfish were randomly fed, the expression rhythms of *gPer1a*, *gPer2a*, and *gCry3* were entrained by the photoperiod, and the peak expression of the three genes seemed to precede the light-onset (acrophases \sim ZT 18-20). This anticipation of light-on is a common feature of *Per1* expression in most studied fish species, such as in zebrafish brain and peripheral tissues (López-Olmeda et al., 2010; Pando et al., 2001), rabbit fish brain (Park et al., 2007), Atlantic salmon brain and liver (Huang et al., 2010), trout retina (López-Patiño et al., 2011), and goldfish retina (Velarde et al., 2009). Thus, it can be suggested that as it occurs in zebrafish (Pando et al., 2001; Vatine et al., 2011), *Per1* is a clock-controlled gene in the goldfish (present results).

However, *Per2a* anticipation to light-on in the two groups of goldfish subjected to shifted photocycles was

III. RESULTADOS

670 L. G. Nisembaum et al.

TABLE 2. Parameters defining the clock-genes expression rhythms in the hindgut of goldfish under different light-dark cycles and feeding-time regimes. Cosinor analysis data from Figures 2 and 3 are presented only when the rhythm was consistent by zero-amplitude test (#, $p < .005$) and significant differences found by ANOVA (*, $p < .05$). The confidence interval (99%) of the amplitude values are showed in italics inside the square brackets. All parameters derived from the sinusoidal function are expressed as the value \pm SE. Goldfish were maintained under different lighting conditions and randomly fed or maintained under continuous light and fed with different feeding schedules (see Figure 1).

Gene		LIGHT-DARK CYCLE				FEEDING TIME	
		12L:12D	12D:12L	24D	24L	SF10	SF22
<i>gPer1a</i>	Acrophase (ZT or CT)	19.7 \pm .6	20 \pm 1		17.5 \pm .9	21 \pm .6	20.4 \pm 1.1
	Amplitude (fold change)	19.9 \pm 3.6	7.5 \pm 2.1		7.3 \pm 1.8	33.3 \pm 5.7	57.6 \pm 19.2
	Confidence Interval	[9.9,29.9]	[1.6,13.4]		[2.3,12.2]	[17.4,49.2]	[4,111.1]
	Statistics	# *	# *		# *	# *	# *
<i>gPer2a</i>	Acrophase (ZT or CT)	19 \pm .96	18.4 \pm 1			.2 \pm 1	
	Amplitude (fold change)	7.3 \pm 2	10.7 \pm 3.1			2.6 \pm .6	
	Confidence Interval	[1.7,12.8]	[1.98,19.3]			[.8,4.46]	
	Statistics	# *	# *			# *	*
<i>gPer3</i>	Acrophase (ZT or CT)	7 \pm .8	17.4 \pm .9	4.6 \pm .8	22.6 \pm 1.3	.5 \pm .5	1.4 \pm .6
	Amplitude (fold change)	9.1 \pm 2.2	13.1 \pm 2.3	1 \pm .2	1 \pm .28	7.8 \pm .9	13.8 \pm 1.6
	Confidence Interval	[3,15.02]	[6.6,19.68]	[.43,1.54]	[.17,1.74]	[5.1,10.54]	[9.25,18.3]
	Statistics	# *	# *	# *	# *	# *	# *
<i>gCry3</i>	Acrophase (ZT or CT)	19.6 \pm .8	20.5 \pm .7			18.9 \pm .6	21.0 \pm 1.3
	Amplitude (fold change)	22 \pm 4.9	22.3 \pm 5			4.3 \pm .7	3.9 \pm 1.3
	Confidence Interval	[8.4,35.6]	[8.3,36.2]			[2.22,6.3]	[.2,7.66]
	Statistics	# *	# *			# *	# *

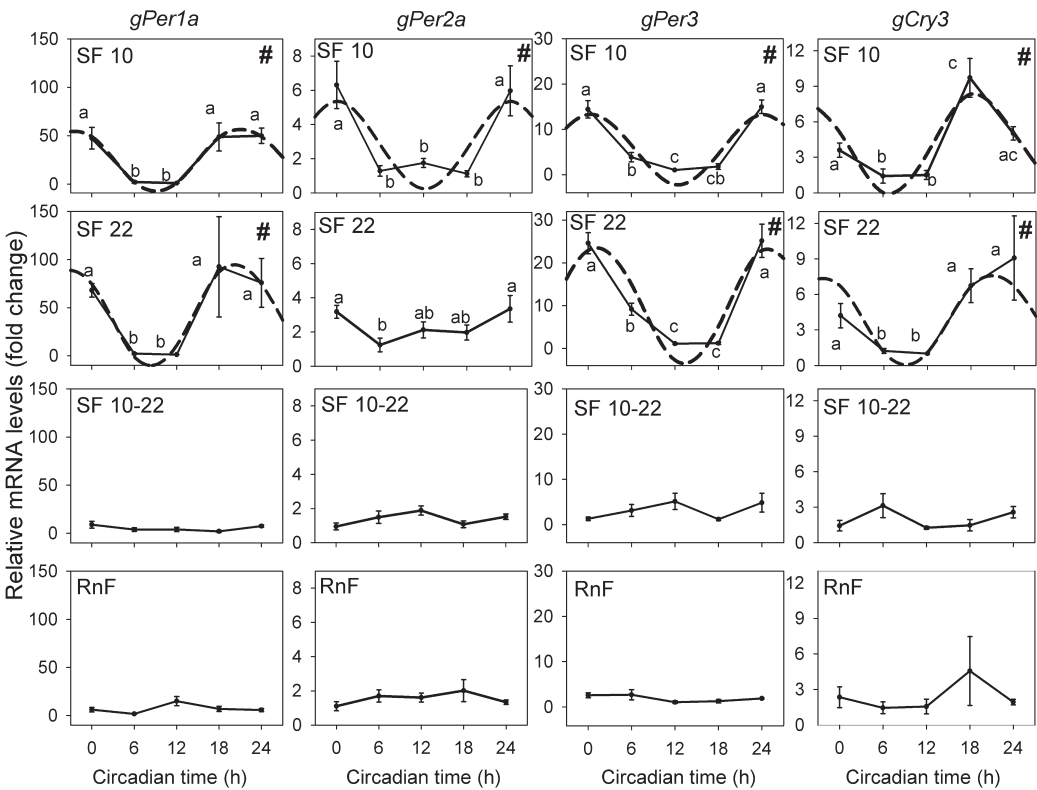


FIGURE 3. Daily profiles of clock-genes expression (from the left to the right *gPer1a*, *gPer2a*, *gPer3*, and *gCry3*) in the hindgut of goldfish maintained under 24L and fed once per day at different hours. CT 0 is defined as the time of the last food delivery. Data obtained by qRT-PCR are shown as the mean \pm SEM (n = 6) in relative units ($\Delta\Delta$ Ct method). When significant (ANOVA, $p < .05$), differences among groups (SNK test) are indicated by different letters. Dashed line represents the periodic sinusoidal functions (#, $p < .005$).

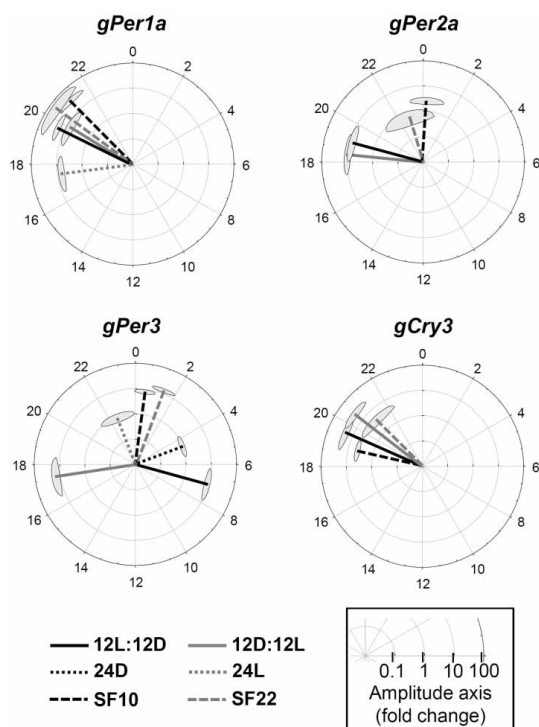


FIGURE 4. Parameters defining the clock-genes expression rhythms in the hindgut of goldfish maintained under different lighting conditions and feeding regimes. Acrophases and amplitudes from sinusoidal functions from Figures 2 and 3 and Table 2 are presented as polar plots, only if the rhythm was consistent or ANOVA indicated significant differences among sampling times. The length of the vector (radial axis) indicates the logarithm of amplitude of the rhythm (relative expression, fold change), while the angular position indicates the acrophase or the hour of maximal gene expression. Time (angular axis) is shown as ZT (12L:12D and 12D:12L) or CT (24D, 24L, SF10, SF22). The SE of these two parameters is represented by the ellipse at the end of the vector.

different from that described in zebrafish. In this latter species, the light-induced feature of *Per2* is well established, and maximal levels of *Per2* expression take place during the daytime in all studied tissues (Pando et al., 2001; Vatine et al., 2009, 2011). The existence of a light-responsive module (LRM) in *Per2* promotor that contains D-box and E-box elements verifies that *Per2* expression is mainly induced by light, although it is secondary regulated by the molecular clock (Vatine et al., 2009). Although goldfish *Per2a* promoter has not been cloned, such LRM is probably present, because it is a very well conserved region from fish to mammals (Vatine et al., 2011), even in cavefish, a cyprinid blind species lacking directly light-entrainable peripheral clocks (Cavallari et al., 2011). In fact, *Per2a* increases after lights-on in goldfish retina (Velarde et al., 2009) and hypothalamus (unpublished own results), with the acrophases close to the middle of the light phase; this rhythm is lost under

24L conditions in the brain and retina (Feliciano et al., 2011). Thus, activation of *gPer2a* expression could possibly be an input for photosensitive molecular clocks also in goldfish. Although the photosensitive property of the hindgut was not investigated in this study, we tentatively suggest that the hindgut of goldfish is a non-light-sensitive organ, and even if the LRM exists there, light would not be able to reach it directly. Thus, *gPer2a* expression is clock-time dependent and not directly light-induced in goldfish hindgut, at least in the presence of a photocycle and under a random feeding regime. Therefore, entrainment of the studied clock genes in the hindgut by the LD cycle probably involves central photosensitive structures that could also be oscillators, such as the retina, pineal gland, or hypothalamus (Feliciano et al., 2011; Vatine et al., 2011; Velarde et al., 2009).

The hindgut of goldfish is a food entrainable oscillator

The four studied clock genes were synchronized by feeding time. A clear *Per1* synchronization by scheduled feeding has been previously reported in the brain, heart, and fin tissue of zebrafish and cavefish when animals were maintained under constant dark (Cavallari et al., 2011). However, under constant light, such rhythms were diminished or nonexistent (López-Olmeda et al., 2010; Vatine et al., 2011), probably due to a masking effect of light that would not affect the goldfish hindgut, since, as discussed above, it is likely to be non-photosensitive. In goldfish maintained under constant light, *Per1a* is synchronized by scheduled feeding in optic tectum, hypothalamus, and liver (Feliciano, et al. 2011), and also in the hindgut (present data). Daily *gPer1a* expression rhythms in schedule-fed goldfish under constant light supports the hypothesis that feeding time is a potent zeitgeber in the goldfish hindgut, as previously demonstrated for the liver in the same teleost (Feliciano et al., 2011) and the liver of mammals (Damiola et al., 2000; Kornmann et al., 2007; Stokkan et al., 2001). Interestingly, the acrophases of the *Per1* rhythms were similar in the three studied cyprinid species, with expression peaks close to the expected meal time or a little bit advanced (zebrafish and cavefish, Cavallari et al., 2011; goldfish, Feliciano et al., 2011, and present data). Thus, *Per1a* in the goldfish hindgut anticipates not only the light-onset, but also food supply when these cues appear in a cyclic manner over time.

Little is known about the role of *gCry3* in the fish molecular clock. From the present data, it can be inferred that it is a clock-controlled gene, because it parallels *gPer1a* daily expression profiles, anticipating also both zeitgebers. It is possible that this gene plays a relevant role in the functioning of the molecular clock in peripheral tissues related to food intake, because *gCry3* is an abundant clock gene in the gut of goldfish (Velarde et al., 2009), and in the liver of this species it is strongly driven by feeding (Feliciano et al., 2011).

The present data also point out that other factors, in addition to schedule feeding, mediate food entrainment in the goldfish hindgut. Rhythmic *gPer1a* expression in

goldfish hindgut was sustained in fish in the absence of any 24-h light cycling signal (24L group), with an amplitude similar to that observed in the presence of a photocycle. The *gPer1a* rhythm in the 24L group of goldfish could be due to the existence of a non-photocycle signal, probably food. Randomly supplied food has been previously proposed to drive *Per1a* in the goldfish liver (Feliciano et al., 2011), and also the rhythmic expression of the enzyme *Aanat2* in the pineal, liver, and hindgut of this species (Velarde et al., 2010).

Clock synchronization by a signal that does not cycle with a 24-h periodicity has been previously reported in mammals (Escobar et al., 2007; Mendoza et al., 2008a; Tahara et al., 2011) and fish (Feliciano et al., 2011). It seems that food entrainment is dependent on the metabolic status and fasting period previous to the food signal (Escobar et al., 2007; Hirao et al., 2010; Mendoza et al., 2008b; Silver et al., 2011), and that an interaction with the LD cycle also exists (Froy et al., 2009; Silver et al., 2011). This could explain why the expression of a clock gene shows rhythmicity sometimes (*gPer1a* in 24L group), but not always (*gPer1a* in 24D, RnF and SF10-22 groups), even though all animals were randomly fed and without any photoperiodic signal. In fact, random feeding protocols were not the same; the fasting-eating intervals and total daily feeding ratio were different, although meal size was always the same. Moreover, the presence of continuous light, instead of constant dark, could also constitute an important factor.

In relation to the last meal event, the present results also indicate that the hindgut of goldfish is highly sensitive to feeding time inputs. A 12-h delay in the last food supply is able to dampen clock-genes expression rhythms in goldfish hindgut that were previously synchronized by feeding time. Maybe, food-entrained rhythms are not "circadian" as classically understood, as previously suggested in mammals (Escobar et al., 2007; Silver et al., 2011).

Light-Dark cycle vs. food: importance of feeding time for *gPer3* and *gPer2a* expression

Surprisingly, and contrary to the other three studied genes, *gPer3* daily rhythms were not driven by the LD cycle. The acrophase of the *gPer3* rhythm coincided at the same hour of the day, i.e., ~13:00-15:00 h, in the 12L:12D, 12D:12L, and 24D exposed animals, suggesting that *gPer3* in the hindgut oscillator was reset by the last meal event, even in the presence of a photocycle. Data from SF fish support the fact the *gPer3* rhythm can be synchronized by feeding time. In addition, it seems the amplitude of the *gPer3* rhythm is similar, regardless of the zeitgeber driving the rhythm (12L:12D, 12D:12L, SF10 and SF 22 groups; Figure 4, Table 2). However, the lower amplitudes under both constant light conditions, compared to the presence of a photocycle, suggest both zeitgebers probably interact to regulate *gPer3* expression in the goldfish hindgut, although the phase of the rhythm seems to be more dependent on the time of the last food supply. The delay in the

acrophase found in the 24L group could be due to a masking effect of constant light. We wish to point out that *gPer3* expression is ~10-fold more abundant in peripheral oscillators than retina of goldfish (Velarde et al., 2009). Moreover, in zebrafish, *Per3* rhythms damp down later in peripheral oscillators than retina (Kaneko et al., 2006). Thus, this tight feeding-time dependence of *gPer3* expression could be involved in the greater sensitivity of peripheral oscillators to feeding cues reported in fish (Feliciano et al., 2011; López-Olmeda et al., 2010; Velarde et al., 2009, 2010). Altogether, the available data on *Per3* in fish suggest to us that the activation of the expression of this gene may be the input that entrains the FEO.

Although there were no clear differences in the amplitude of the *gPer2a* rhythms synchronized by the photocycle or by a scheduled-feeding regime in the goldfish hindgut, our results suggest that feeding time could be more important when both cues are present. Acrophases for *gPer2a* expression occurred at light-onset under photocycle exposure (12L:12D and 12D:12L groups), while in constant light, maximal expression occurred at the expected meal time (SF10 and SF22 groups). Moreover, when both zeitgebers were present, the expression of this gene in the gut did not anticipate light-onset but peaked at the expected meal time (Velarde et al., 2009). This finding supports the contention that regulation of *gPer2a* expression in goldfish is tissue-dependent, because it is driven by light in photosensitive oscillators, but not in the hindgut. It is possible that *gPer2a* in the goldfish hindgut is signalling feeding time, as proposed in mammalian non-directly light-sensitive peripheral oscillators (Hirao et al., 2010; Oike et al., 2011; Tahara et al., 2011).

In summary, the present data point to the existence of an oscillator in the hindgut of goldfish that can be synchronized in vivo by both cues, photocycle and feeding time. However, these two zeitgebers regulate the expression of the studied clock genes in a different way. The *gPer1a*, *gPer2a*, and *gCry3* genes anticipate light-onset and also food supply when these cues appear in a circadian manner, while *gPer3* timing seems to be more dependent on the occurrence of the last food supply than on the photocycle. Food randomly supplied is also able to reset the clock, but not always, and one shifted meal abolishes clock-genes expression rhythms synchronized by feeding time. Future studies will be directed to investigate the influence of the energetic and metabolic status of the animals on food-entraining power.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the UCM-Santander (GR35/10) and by the Spanish MICINN (AGL2010-22247-C03-02). L. Nisembaum and A.B. Tinoco are predoctoral fellowship from the Spanish MAEC-AECID and MICINN, respectively. The authors also thank the

reviewers and the editor for their useful comments and suggestions.

Declaration of Interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- Cahill GM. (2002). Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res.* 309:27–34.
- Cavallari N, Frigato E, Vallone D, Fröhlich N, López-Olmeda JF, Foà A, Berti R, Sánchez-Vázquez FJ, Bertolucci C, Foulkes NS. (2011). A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. *PLoS Biol.* 9:e1001142.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14:2950–2961.
- Delgado MJ, Alonso-Gómez AL, Gancedo B, De Pedro N, Valenciano AI, Alonso-Bedate M. (1993). Serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity and melatonin levels in the frog retina are not correlated during the seasonal cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 92:143–150.
- Duggleby RG. (1981). A nonlinear regression program for small computers. *Anal. Biochem.* 110:9–18.
- Escobar C, Martínez-Merlos MT, Angeles-Castellanos M, del Carmen Miñana M, Buijs RM. (2007). Unpredictable feeding schedules unmask a system for daily resetting of behavioural and metabolic food entrainment. *Eur. J. Neurosci.* 26:2804–2814.
- Feliciano A, Vivas Y, de Pedro N, Delgado MJ, Velarde E, Isorna E. (2011). Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *J. Biol. Rhythms* 26:24–33.
- Froy O, Chapnik N, Miskin R. (2009). Effect of intermittent fasting on circadian rhythms in mice depends on feeding time. *Mech. Ageing Dev.* 130:154–160.
- Halberg F, Reinberg A. (1967). Rythmes circadiens et rythmes de basse fréquence en physiologie humaine. *J. Physiol. (Paris)*. 59:117–200.
- Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES. (2007). Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J. Endocrinol.* 195:187–198.
- Hirao A, Nagahama H, Tsuboi T, Hirao M, Tahara Y, Shibata S. (2010). Combination of starvation interval and food volume determines the phase of liver circadian rhythm in Per2:Luc knock-in mice under two meals per day feeding. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299:1045–1053.
- Huang TS, Ruoff P, Fjellidal PG. (2010). Effect of continuous light on daily levels of plasma melatonin and cortisol and expression of clock genes in pineal gland, brain, and liver in Atlantic salmon postsmolts. *Chronobiol. Int.* 27:1715–1734.
- Kaneko M, Hernández-Borsetti N, Cahill GM. (2006). Diversity of zebrafish peripheral oscillators revealed by luciferase reporting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:14614–14619.
- Kornmann B, Schaad O, Reinke H, Saini C, Schibler U. (2007). Regulation of circadian gene expression in liver by systemic signals and hepatocyte oscillators. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72:319–330.
- Koukari WL, Sothorn RB. (2006). Chronobiometry: analyzing for rhythms. In *Introducing Biological Rhythms*. New York: Springer Science, 577–602.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods* 25:402–408.
- López-Olmeda JF, Sánchez-Vázquez FJ. (2010). Feeding rhythms in fish: from behavioural to molecular approach. In: Kulczykowska E, Popek W, Kapoor BG (Eds). *Biological clock in fish*. Enfield: Science Publishers, 155–183.
- López-Olmeda JF, Tartaglione EV, de la Iglesia HO, Sánchez-Vázquez FJ. (2010). Feeding entrainment of food-anticipatory activity and per1 expression in the brain and liver of zebrafish under different lighting and feeding conditions. *Chronobiol. Int.* 27:1380–1400.
- López-Patiño MA, Rodríguez-Illamola A, Conde-Sieira M, Soengas JL, Míguez JM. (2011). Daily rhythmic expression patterns of clock1a, bmal1, and per1 genes in retina and hypothalamus of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Chronobiol. Int.* 28:381–389.
- Mendoza J, Drevet K, Pévet P, Challet E. (2008a). Daily meal timing is not necessary for resetting the main circadian clock by calorie restriction. *J. Neuroendocrinol.* 20:251–260.
- Mendoza J, Pévet P, Challet E. (2008b). High-fat feeding alters the clock synchronization to light. *J. Physiol.* 586:5901–5910.
- Mistlberger RE. (2011). Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiol. Behav.* 104:535–545.
- Noche RR, Lu PN, Goldstein-Kral L, Glasgow E, Liang JO. (2011). Circadian rhythms in the pineal organ persist in zebrafish larvae that lack ventral brain. *BMC Neurosci.* 12:7.
- Oike H, Nagai K, Fukushima T, Ishida N, Kobori M. (2011). Feeding cues and injected nutrients induce acute expression of multiple clock genes in the mouse liver. *PLoS One* 6:e23709.
- Panda S, Hogenesch JB, Kay SA. (2002). Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417:329–335.
- Pando MP, Pinchak AB, Cermakian N, Sassone-Corsi P. (2001). A cell-based system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the vertebrate clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:10178–10183.
- Park JG, Park YJ, Sugama N, Kim SJ, Takemura A. (2007). Molecular cloning and daily variations of the *Period* gene in a reef fish *Siganus guttatus*. *J. Comp. Physiol. A* 193:403–411.
- Portaluppi F, Smolensky MH, Touitou Y. (2010). Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. *Chronobiol. Int.* 27:1911–1929.
- Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA, Zamora S, Tabata M. (1997). Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding-entrainable circadian oscillator. *J. Comp. Physiol. A* 181:121–132.
- Silver R, Balsam PD, Butler MP, LeSauter J. (2011). Food anticipation depends on oscillators and memories in both body and brain. *Physiol. Behav.* 104:562–571.
- Stephan FK. (2002). The “other” circadian system: food as a Zeitgeber. *J. Biol. Rhythms* 17:284–292.
- Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291:490–493.
- Tahara Y, Otsuka M, Fuse Y, Hirao A, Shibata S. (2011). Refeeding after fasting elicits insulin-dependent regulation of *Per2* and *Rev-erba* with shifts in the liver clock. *J. Biol. Rhythms* 6:230–240.
- Vatine G, Vallone D, Appelbaum L, Mracek P, Ben-Moshe Z, Lahiri K, Gothilf Y, Foulkes NS. (2009). Light directs zebrafish period2 expression via conserved D and E boxes. *PLoS Biol.* 7:e1000223.
- Vatine G, Vallone D, Gothilf Y, Foulkes NS. (2011). It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett.* 585:1485–1494.
- Velarde E, Haque R, Iuvone PM, Azpeleta C, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ. (2009). Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus*: cDNA cloning and rhythmic expression of *period* and *cryptochrome* transcripts in retina, liver, and gut. *J. Biol. Rhythms* 24:104–113.
- Velarde E, Cerdá-Reverter JM, Alonso-Gómez AL, Sánchez E, Isorna E, Delgado MJ. (2010). Melatonin-synthesizing enzymes in pineal, retina, liver and gut in the goldfish (*Carassius auratus*): cloning, mRNA expression pattern and regulation of daily rhythms by lighting conditions. *Chronobiol. Int.* 27: 1178–1201.
- Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. (2000). Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* 404:87–91.

III. RESULTADOS



Orexin as an input of circadian system in goldfish: Effects on clock gene expression and locomotor activity rhythms

q1 Laura G. Nisembaum, Nuria de Pedro, María J. Delgado,
Aída Sánchez-Bretaña, Esther Isorna*

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2013

Received in revised form

13 November 2013

Accepted 13 November 2013

Available online xxx

Keywords:

Orexin-A

Clock gene

Locomotor activity

Food anticipatory activity

Hypothalamus

Foregut

ABSTRACT

Orexins are neuropeptides mainly known for regulating feeding behavior and sleep–wakefulness cycle in vertebrates. Daily variations of orexin-A expression have been reported in fish, with the highest levels preceding feeding time. However, it is unknown if such variations could be related with daily rhythms of clock genes, which form the molecular core of circadian oscillators. The aim of the present study was to identify the possible role of orexin as an input element of the goldfish circadian system. It was investigated the effects of orexin-A (10 ng/g bw) intracerebroventricular injections on the expression of clock genes, NPY and ghrelin, as well as on daily locomotor activity rhythms. Goldfish held under 12L:12D photoperiod and injected at midday with orexin or saline, were sacrificed at 1 and 3 h post-injection. The analysis of genes expression by qReal Time PCR showed an increment of *Per* genes in hypothalamus and foregut at 3 h post-injection, but not in hindgut and liver. The *gBmal1a* expression remained unaltered in all the studied tissues. Orexin induced NPY in the hypothalamus and ghrelin in the foregut. Locomotor activity was studied in fish daily injected with orexin for several consecutive days under different experimental conditions. Orexin synchronized locomotor activity in goldfish maintained in 24L and fasting conditions. Present results support a cross-talking between orexin-A and other feeding regulators at central and peripheral level, and suggest, for the first time, a role of this peptide as an input of the circadian system in fish.

© 2013 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

The orexins/hipocretins neuropeptides, orexin-A and orexin-B, are generated by the proteolytic cleavage of a precursor, prepro-orexin, mostly produced in mammals in feeding regulatory centers as the perifornical and lateral hypothalamic areas [10,31] with widespread fiber projections through the brain [10]. In non-mammalian vertebrates, orexin neurons are also present in different brain areas, and particularly in the hypothalamus of amphibians [42], reptiles [13] and birds [43]. In fish, conservation of gene sequence, hypothalamic localization of cell bodies, and projection patterns, revealed that the architecture of the orexin system appears well conserved [3,25,55,56].

Accordingly with this broad anatomical distribution, orexins are involved in the regulation of many functions in mammals,

as feeding behavior, energy homeostasis, cardiovascular control, sleep–wake cycle and in the reward system [35,44]. The knowledge on the physiological functions of orexins in fish is still limited, but published results suggest conserved functions. The orexigenic action of orexins is a well known function in fish. Centrally administered orexin A, but not orexin B, stimulates food intake with different intensities in different species [30,51,57]. Neuroanatomical and physiological evidences support the interactions among orexin and others appetite-regulating peptides, as NPY [53,56], leptin [52], ghrelin [29], and TRH [1]. Moreover, increases in hypothalamic orexin-like immunoreactivity and orexin mRNA by fasting support this orexigenic action in fish [1,30,54]. Nevertheless, mutant orexin receptor-null zebrafish (*Danio rerio*) displays food intake similar to that of wild-type fish [58].

The role of orexins on activity is still largely unknown in fish. In zebrafish, unlike in mammals, exogenous orexin seems to be a mild sedative not being a strong stimulant [58]. A null mutation in the sole receptor for the orexin causes sleep fragmentation at dark and disrupts the consolidation of sleep/wake behavior in zebrafish adults [3,58], whereas orexin overexpression in larvae inhibits rest and promotes and consolidates wakefulness [38]. Recently, immunohistochemical studies have shown an increased neural activity of hypothalamic orexin-positive neurons correlated

Abbreviations: 24L, constant light; FAA, food anticipatory activity; ICV, intracerebroventricular; LD Cycle, light–dark cycle; ZT, Zeitgeber time.

* Corresponding author at: Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, C/José Antonio Novás 12, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 913944984; fax: +34 913944935.

E-mail address: eisornaa@bio.ucm.es (E. Isorna).

0196-9781/\$ – see front matter © 2013 Published by Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2013.11.014>

Please cite this article in press as: Nisembaum LG, et al. Orexin as an input of circadian system in goldfish: Effects on clock gene expression and locomotor activity rhythms. Peptides (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2013.11.014>

Table 1
Primers used for qRT-PCR studies.

Target gene	Accession number		Primer sequences 5' → 3'	Product (pb)
<i>gPer1a</i>	EF690698	Forward	AGCGCCACTTCTCTCTGA	130
		Reverse	TGAAGACGTCTGTCCGTTGG	
<i>gPer2a</i>	EF690697	Forward	TTTGTCAATCCCTGGAGCCGC	116
		Reverse	AAGGATTTCCTCAGCCACG	
<i>gPer3</i>	EF690699	Forward	GGCTATGGCAGTCTGGCTAGTAA	130
		Reverse	CAGCAGAAAACCGCTGCAATGTC	
<i>gCry3</i>	EF690702	Forward	GGTGAGACAGAAGCCCTGGAA	102
		Reverse	GCTTGCAGACAGTATTGAGCG	
<i>Bmal1a</i>	KF840401	Forward	ATCGATGAGTCGTTCCCGTG	161
		Reverse	AGATTCTGTTCTCTCGGAG	
<i>gGhrl</i>	AF454390	Forward	TTTCATGATGAGTCTCCGTTTC	124
		Reverse	GTCAGAAATCAAGTGGCGAATC	
<i>gNpy</i>	M87297	Forward	TTCTGTCGTTGGGAACCTCT	151
		Reverse	TGGACCTTTGCCATACCTC	
<i>gβ-actin</i>	AB039726	Forward	GGCTCCCTGTCTATCTTCC	156
		Reverse	TTGAGAGGTTGGGTGGTC	

to periods of increased locomotor activity [32]. In goldfish (*Carassius auratus*), an increase in locomotion has been reported 1 h after central injection of mammalian orexin-1, but immunoneutralisation of orexins did not change locomotor activity [30].

Reports in mammals pointed to some interactions between orexin signaling and the circadian system. Orexin neurons are present in brain regions involved in the circadian organization in mammals as the hypothalamic suprachiasmatic nucleus [12,59]. On the other hand, daily variations of hypothalamic orexin with high levels around mealtime and during the daily active period have been shown in rodents [60]. A relationship between orexin and synchronization by food in mice is supported by shifts of the *Fos* expression in orexin neurons induced by restricted feeding [2], and by reductions of food anticipatory activity (FAA) in orexin neuron-ablated mice [2,28]. In fish very few data exist on possible interactions between orexin and the circadian system. Some evidences in zebrafish larvae have shown higher effects of orexin overexpression under constant darkness or constant light than in light–dark conditions [38]. On the other hand, the synaptic structures in orexin cells projecting to the pineal gland and the hindbrain displays a circadian rhythmicity in this teleost [4]. Recently, it is described a peak in hypothalamic prepro-orexin mRNA levels at mealtime in scheduled fed orange-spotted grouper, (*Epinephelus coioides*) [56] and goldfish [21]. Besides, orexin mRNA levels increase during the active phase and decrease during the rest in the Atlantic cod (*Gadus morhua*) [20] and goldfish [21].

In goldfish daily fluctuations of some clock genes and their regulation by light–dark cycle and feeding time have been characterized in some central and peripheral locations [15,33,49], but nothing is known on possible cross regulation between orexin signaling and the circadian system. Deep into this intriguing subject on orexin and circadian system crosstalk in fish, we firstly investigated the possible acute effects of central administration of orexin on central and peripheral clock genes expression in goldfish. Secondly, we studied the possible role of orexin as a zeitgeber in goldfish maintained under different photoperiodic and feeding conditions, analyzing if orexin synchronizes the daily locomotor activity rhythm, a well-known output of circadian system.

2. Materials and methods

2.1. Animals and housing

Goldfish (11.4 ± 0.3 g) were purchased from a commercial local supplier and maintained in the laboratory in 60 l tanks (*n* = 8/tank). Before the experiment, fish were acclimated at least for two weeks under 12L:12D photoperiod (lights on at 08:00 h) and scheduled

feeding at 10:00 h with dry pellets (Sera Pond Bio-flakes, Sera Biogram, Germany) at 1% body weight (bw). The fish handling procedures were in accordance with the Guidelines of the European Union Council (2010/63/EU) for the use of research animals and were approved by the Animal Experimentation Committee of Complutense University of Madrid.

2.2. Effects of orexin A acute treatment on gene expression

Fish maintained for 2 weeks under 12L:12D photoperiod and scheduled feeding at 10:00 h (2 weeks) received one intracerebroventricular (ICV) injection 4 h after feeding (14:00 h, zeitgeber time ZT6) with saline (1 µl; *n* = 14) or orexin (10 ng/g bw, American Peptide, Sunnyvale, USA; *n* = 14). The chosen dose was previously shown to be effective inducing food intake (51) and locomotor activity (30) in goldfish. For injections fish were anesthetized in water containing tricaine methanesulphonate (MS-222, 0.1 g/l, Sigma Chemical, Madrid, Spain). Immediately after loss of equilibrium animals were ICV injected as previously established [11], and after the injections fish were placed in anesthetic-free water tanks where swimming activity and equilibrium was recovered within 1–2 min. At 1 and 3 h post-injection fish were sacrificed (*n* = 7/group), and central (hypothalamus) and peripheral (liver, foregut and hindgut) tissues were sampled and stored at –80 °C until used.

The expression of clock genes (*gPer1a*, *gPer2a*, *gPer3* and *gBmal1a*) in hypothalamus, foregut, hindgut and liver, and the expression of hypothalamic NPY and ghrelin in foregut were quantified by RT-qPCR in a CFX96TM Real-Time System (Biorad Laboratories, Hercules, USA) as previously described [33]. In brief, the total RNA from goldfish tissues was extracted with Trizol (TRI® Reagent method, Sigma Chemical, Spain) and treated with DNase (Promega, Madison, USA) at 37 °C for 40 min to eliminate genomic DNA. Then, the RNA (1 µg/µl for hypothalamus, hindgut and liver, and 0.5 µg/µl for foregut) was retro-transcribed by using the SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA). The PCR reactions were performed in a 20 µl final volume using 10 µl iTaqTM SYBR® Green Supermix (BIORAD LABORATORIES, Hercules, USA), specific primers (0.4 µM; Sigma Chemical, Madrid, Spain; see Table 1) and 1 µl cDNA for all genes except for *gGhrl* where 3 µl of cDNA were used. The protocol for measuring mRNA expression was as follows for *Per* genes: 1 cycle at 95 °C for 3 min and 40 cycles consisting in 95 °C for 10 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 45 s. The annealing temperature varied for *Bmal1a* (55 °C), *gGhrl* (62 °C), *gNpy* (64 °C), and for β-actin (60 °C) used as reference gene. The specificity of the amplification was checked by the size of the products in agarose gels and by the existence of only one peak at the expected

melting temperature analyzed at the end of all PCR reactions. The high efficiency of reactions was ensured by RNA and cDNA dilution curves showing efficiencies in the range of 95–105% for all studied genes. All samples were analyzed in duplicated and the relative mRNA expression was determined by the $\Delta\Delta C_t$ method [26] and represented by fold change. The C_t values obtained for the studied genes vary among tissues but were in the range of 19–24 for β -actin, 22–28 *gPer1a*, 23–28 for *gPer2a*, 21–24.5 for *gPer3*, 23–28 for *gBmal1a*, 26–27 for hypothalamic NPY and 27–28 for ghrelin in the foregut.

2.3. Effects of orexin A subchronic treatment on synchronization of locomotor activity daily rhythms

The experimental period consisted in 3 phases. First, fish were maintained during 2 weeks under constant light (24L) and randomly fed to suppress the synchronizing effect of both, LD cycle and feeding time as zeitgebers. Then, fish were daily ICV injected as above described with 1 μ l saline (2 tanks, $n=8$) or 1 μ l orexin A (10 ng/g bw, 2 tanks, $n=8$) at 10:00 h (ZT 2) during 8 days. Second, fish under constant light conditions (24L) and 3-days fasting (to eliminate the possible masking effect of food intake on locomotor activity) were daily ICV injected during 4 days under these conditions (24L and fasting). Third, fish acclimated for 6 weeks under 12L:12D photoperiod and feeding at 22:00 h (ZT 14) were daily ICV injected during 8 days under food deprivation. Daily locomotor activity and FAA were daily registered as previously described [6] using three infrared photocells. Locomotor activity data were analyzed using a chronobiology software “El temps®”. Actograms were doubled plotted for better visualization.

2.4. Statistics

The statistical analyses were performed using the Statgraphics software (StatPoint Technologies, version 5.1). Statistical differences in gene expression among the different sampling times were determined by one way analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc test (Student–Newman–Keuls, SNK). When necessary, values were logarithmic or square root transformed to reach a normal distribution and homogeneity of variances. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Circadian periods of daily activity rhythms were calculated by constructing chi-square periodograms with a significance level set at 0.05 (“El temps®”).

3. Results

3.1. Effects of orexin A acute treatment on clock genes expression

The expression levels of some clock genes from the period family (negative elements of the main circadian loop) were measured at central level in the hypothalamus (Fig. 1), and at peripheral level in the foregut and hindgut (Fig. 2), and liver (Fig. 3) at 1 h and 3 h after an acute orexin injection. As a general rule, at 1 h post-injection no changes in *Period* genes expression were observed, except for *gPer2a* expression in the hypothalamus (Fig. 1) and for *gPer3* in the liver (Fig. 3). However, at 3 h after orexin injection the expression of some genes increased in the hypothalamus and in the foregut. In the hypothalamus of orexin-treated fish the abundance of the three *Period* genes analyzed increased ~ 1.8 fold compared to control fish at 3 h post-injection (Fig. 1). This orexin-induced increase in the gene expression was statistically significant for *gPer2a* and *gPer3*, being very close to the significance level ($p = 0.05$) for *gPer1a*. An acute ICV administration of orexin also modified clock genes expression in the foregut (Fig. 2), being the *gPer1a* and *gPer3* expression of orexin-injected animals around 2.5 fold higher

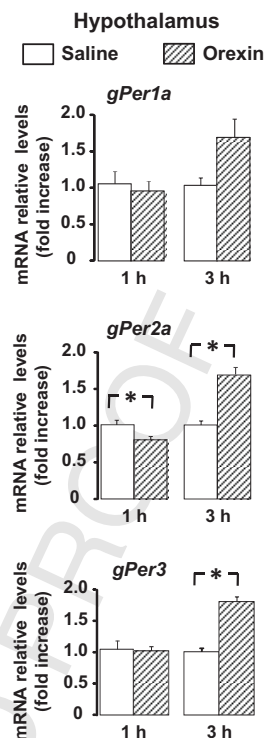


Fig. 1. Clock-gene expression (*gPer1a*, *gPer2a* and *gPer3*) in the hypothalamus of goldfish, 1 and 3 h post-injection with saline or orexin. Data obtained by qRT-PCR are shown as the mean \pm SEM ($n=7$ /group). Expression values are presented in relative units as fold change respect to the control group at each hour. Significant differences among groups (ANOVA, $p < 0.05$ followed by SNK test) are indicated by asterisks.

than in control fish. None of the studied clock genes were altered in the hindgut by orexin at any studied time post-injection. Orexin decreased *gPer3* expression in the liver at 1 h post-injection. But, no significant differences were found in hepatic *gPer1a*, *gPer2a* or *gPer3* expression in orexin treated animals compared to controls at 3 h post-injection (Fig. 3).

The expression levels of a positive element of the main circadian loop, the clock gene *gBmal1a*, were unaffected by orexin central treatment, neither at central location (hypothalamus) nor at peripheral tissues (foregut, hindgut and liver) at any post-injection studied times (data not shown).

3.2. Effects of orexin A acute treatment on NPY and ghrelin expression

The ICV orexin injection clearly induced the expression of two well known orexigenic peptides in goldfish, the NPY and ghrelin. Hypothalamic NPY mRNA increased significantly (~ 6 fold) at 3 h post-injection (Fig. 4), and this stimulation seems to be started before, since NPY expression levels at 1 h post-injection were higher in orexin treated than in control fish. A similar stimulatory effect of orexin was found on ghrelin expression in the goldfish foregut (Fig. 4). The mRNA increment of this orexigenic peptide in the foregut was observed at only 1 h post-injection, with mRNA levels more than 10-fold higher in orexin injected fish. This stimulatory effect of orexin disappeared at 3 h post-injection, when the relative abundance of *gGhrl* was very similar in control and orexin-treated fish, and compared to values measured at 1 h post-injection in control fish.

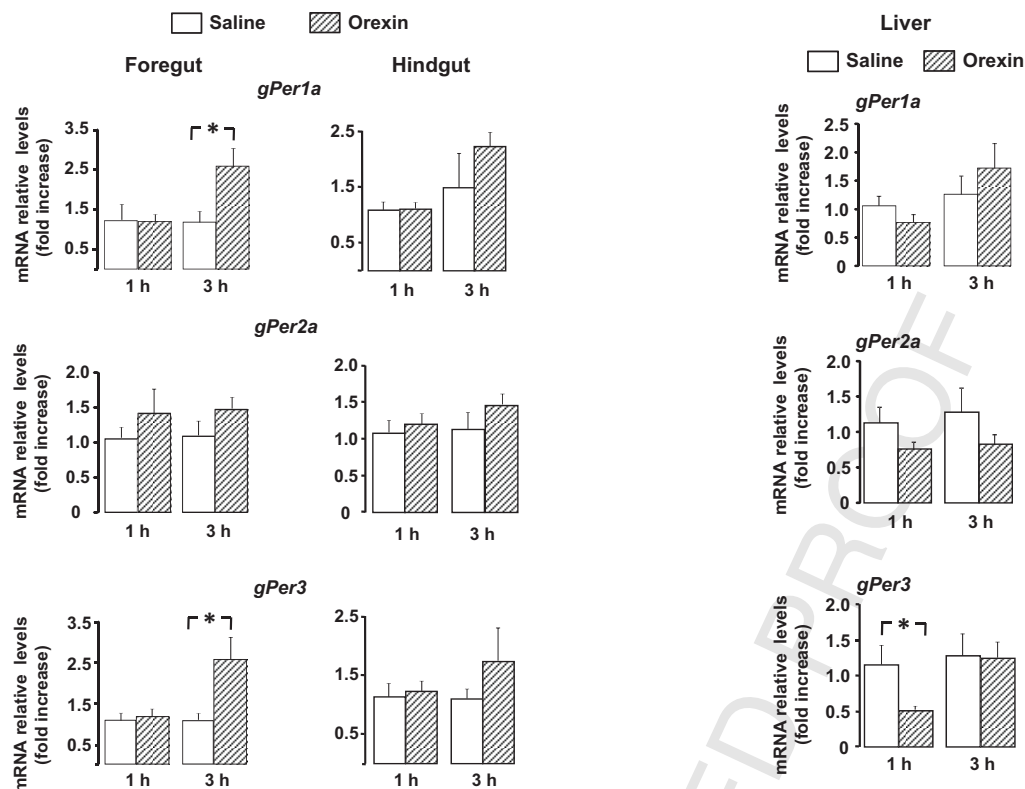


Fig. 2. Clock-gene expression (*gPer1a*, *gPer2a* and *gPer3*) in the foregut and hindgut of goldfish, 1 and 3 h post-injection with saline or orexin. Data obtained by qRT-PCR are shown as the mean \pm SEM ($n = 7$ /group). Expression values are presented in relative units as fold change respect to the control group at each hour. Significant differences among groups (ANOVA, $p < 0.05$ followed by SNK test) are indicated by asterisks.

3.3. Effects of orexin A subchronic treatment on synchronization of locomotor activity daily rhythms

Daily locomotor activity was registered during 2-weeks before injections and throughout the three experimental phases in all tanks. Representative actograms and periodograms obtained at the different phases are shown in the Fig. 5(A–C).

First phase (Fig. 5A): As expected, fish maintained in absence of zeitgebers (24L and randomly fed) before the orexin injections period did not show 24 h rhythm in locomotor activity (evidenced as no significant periodograms). Then, the actograms show the daily activity of representative tanks with saline and orexin-treated fish during the 8-days injection period and 2-days after). The orexin subchronic treatment under these environmental conditions did not modify the locomotor activity or induce daily rhythms, as indicated by no significant periods of locomotor activity in orexin injected fish.

Second phase (Fig. 5B): Similarly to the first phase, before the orexin treatment goldfish under 24L and 3-days fasted did not show 24 h rhythms in locomotor activity (evidenced as no significant periodograms). Actograms and periodograms of representative tanks with saline and orexin-treated fishes during the 4-days injection period (and 2-days after) show that a significant activity rhythm (with a period around 24 h) has been induced by the orexin treatment, while saline injected fish remained arrhythmic. The activity data as counts registered during the all experimental period are shown in Fig. 6. It can be observed that orexin-treated

Fig. 3. Clock-gene expression (*gPer1a*, *gPer2a* and *gPer3*) in the liver of goldfish, 1 and 3 h post-injection with saline or orexin. Data obtained by qRT-PCR are shown as the mean \pm SEM ($n = 7$ /group). Expression values are presented in relative units as fold change respect to the control group at each hour. Significant differences among groups (ANOVA, $p < 0.05$ followed by SNK test) are indicated by asterisks.

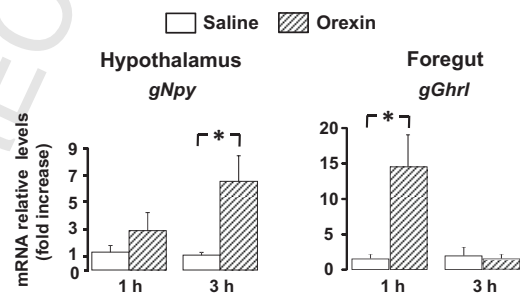


Fig. 4. Gene expression of the feeding regulators (*gNpy* and *gGhr1*) in the hypothalamus and foregut of goldfish, 1 and 3 h post-injection with saline or orexin. Data obtained by qRT-PCR are shown as the mean \pm SEM ($n = 7$ /group). Expression values are presented in relative units as fold change respect to the control group at each hour. Significant differences among groups (ANOVA, $p < 0.05$ followed by SNK test) are indicated by asterisks.

fish showed a peak of activity anticipating the time of orexin injection with a higher activity 2 h before the injection time (131.5 ± 24.6 counts/10 min) than the activity mean during the rest of the day (65.9 ± 11.4 counts/10 min). This peak in activity is conserved during the 2-days after (Fig. 5B), but it does not exist in the control fish, that showed similar activity levels before the injections than during the rest of the day.

Third phase (Fig. 5C): The aim of this experimental phase was to study if orexin could act as a signal of feeding time being involved in

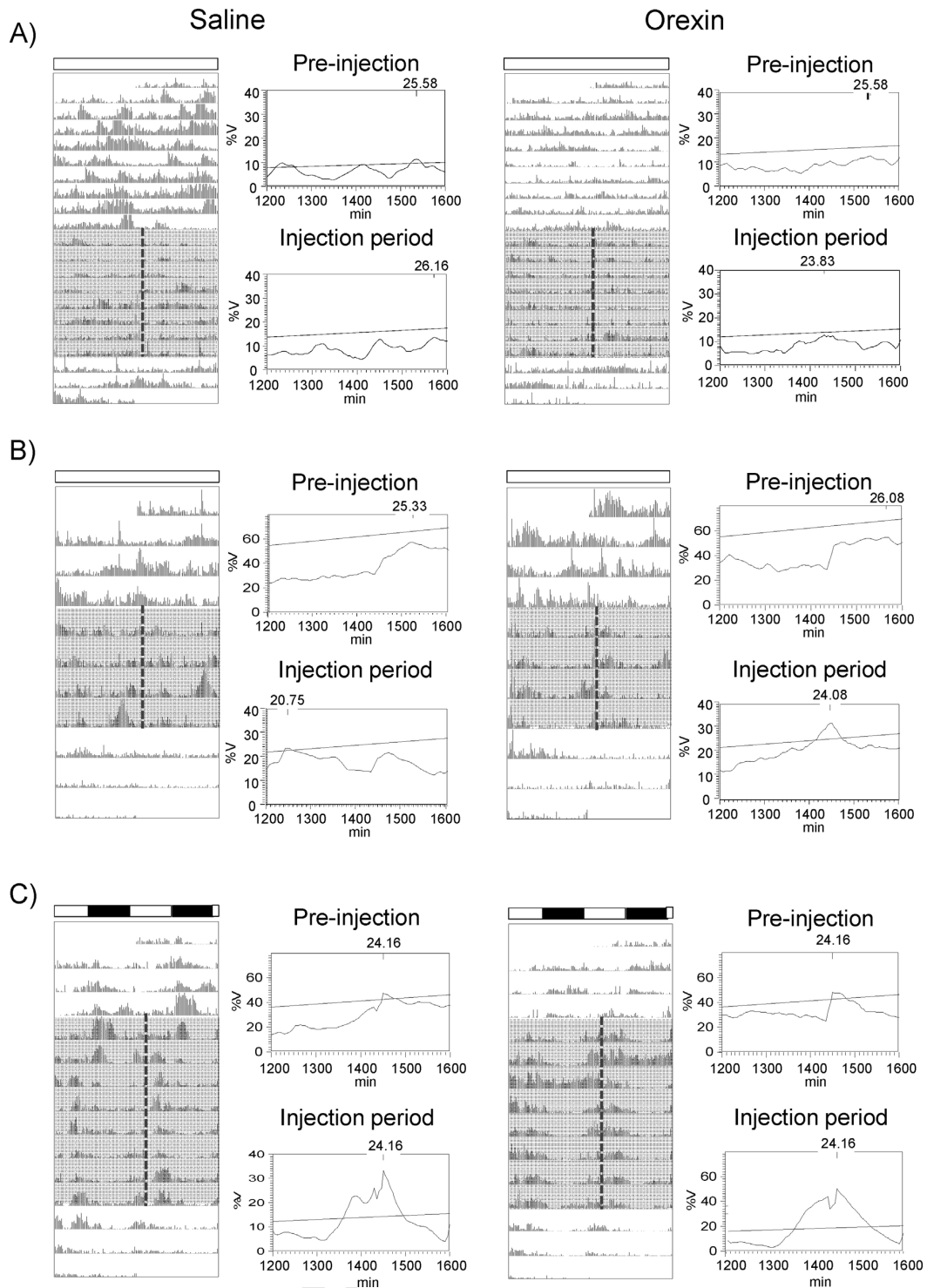


Fig. 5. Representative actograms and periodograms of the locomotor activity of saline and orexin injected goldfish ($n=8/\text{group}$), in the three experimental phases: (A) fish acclimated under 24L, randomly fed and injected during 8 days; (B) fish under 24L, food deprived and injected during 4 days; (C) fish acclimated under 12L:12D and fed at 22:00 h for 6 weeks, injected during 8 days under food deprivation. All phases are represented with 4–10 days before and 2 days after the injection period. The gray square corresponds to the injection period. The dashed line indicates the exact time of the injection. Peaks over the threshold line in the periodogram indicate a significant rhythm.

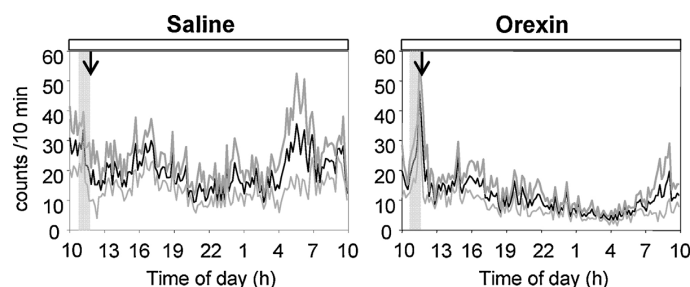


Fig. 6. Average waveform of locomotor activity in saline and orexin injected goldfish of the same representative tanks showed in the Fig. 5 during the phase B of the experiment (24L, food deprived and treated during 4 days). The black line represents the activity mean calculated from 4 consecutive days, while the gray lines represent the SEM.

the generation of the FAA, even in the presence of a daily photocycle. Goldfish maintained under 12L:12D and fed at ZT14 exhibited a nocturnal activity rhythm during the pre-injection period with a 24.1 h period, being the highest activity levels before the food supply. Saline and orexin-treated fish showed 24 h activity rhythms in both saline and orexin groups in fasting conditions during the 8-days injection period and 2-days after, that probably are induced by the LD cycle. No clear effects of orexin injections were observed on daily activity profiles in the third experimental phase. Thus, at the end of treatment all fish (saline and orexin-treated) showed 24 h diurnal activity patterns under these 12L:12D and fasting conditions.

4. Discussion

Present results show for the first time that ICV injected orexin induces the expression of clock genes of the negative loop in hypothalamus and foregut oscillators, suggesting that this peptide can act as an input to the circadian system in the goldfish. Clock genes, as the molecular machinery of the oscillators, are mainly entrained by the LD cycle in many vertebrates including fish [22,48]. But also other environmental cues as feeding time can synchronize clock genes expression in fish, as reported particularly in goldfish [15,33,49]. However, scarce data is available on endogenous peptides as input signals to the circadian system in vertebrates and no information to date exists in fish.

The up-regulation of the three *Period* genes, *gPer1a*, *gPer2a* and *gPer3*, in goldfish hypothalamus at 3 h after orexin injection (in satiated fish) indicates that this peptide may regulate the daily functioning of this brain structure, acting as an input to the hypothalamic oscillator in the goldfish. In this sense, previous reports in rodents showed that hypothalamic orexin neurons are involved in the transmission of circadian signals to the locus coeruleus [16], and ablation of orexin neurons reduced the *Per1* mRNA expression in the forebrain [2]. In addition, the preprandial peak in hypothalamic orexin mRNA expression observed in goldfish [21] and other fish [20,56], as expected for an orexigenic agent, suggests that orexin may be a putative endogenous input that provides to the circadian system a signal preceding food supply under scheduled feeding conditions. This hypothesis is supported by results in mice that show a relationship between orexin and FAA [2,28].

Regarding peripheral clocks, we also found the induction of clock genes expression in foregut by orexin, reinforcing the suggested role of this peptide as an input to the circadian system in goldfish. In fact, the circadian organization in fish is nowadays considered as a network of central and peripherally clocks [7,15,22,34], and present results support common responses to putative endogenous synchronizers in both, central and peripheral locations. Nevertheless, we found some differences among the studied peripheral clocks, the orexin treatment did not produce

significant effects on hindgut and liver clock genes expression, with the exception of a rapid and transient decrease of liver *gPer3* at 1 h post-injection that disappears at 3 h post-injection with unclear meaning. The absence of changes in the studied clock genes in hindgut and liver might indicate that orexin is only acting on targets involved in the orexigenic signalization, as the hypothalamus at central level and the foregut, the main origin of peripheral orexigenic peptides (e.g. ghrelin) in a stomachless species, as the goldfish [47]. The existence of a cross-talking among these regions through orexigenic signals [20,29, present results], might explain the induction of clock genes by orexin in foregut but not in hindgut.

Recently some studies in goldfish have investigated daily rhythmic profiles of clock genes synchronized to different environmental cues [7,15,33,49]. The genes *per1a* and *per3* can be synchronized to the LD cycle or to a feeding schedule in the brain and peripheral locations, although peripheral clocks as a rule are more sensitive to food related cues [15,33]. The induction by orexin of *gPer1* and *gPer3* expression in the foregut was a little bit higher than in hypothalamus, which could be related with such higher sensitivity to food related cues in gastrointestinal tissues than in the central ones.

It is largely known that light directly induces *per2* expression in all zebrafish tissues [22,48]. However, in goldfish *per2* regulation differs between central (retina and the hypothalamus) and peripheral structures, being directly induced by light only in central ones [7,33,49]. In the foregut *gPer2a* mRNA was not modified by orexin, although it was increased in the hypothalamus, reinforcing the idea of different regulatory mechanisms for this gene in central versus peripheral tissues.

The unaltered expression of *gBmal1*, an element of the positive loop of the clock that drives expression of the negative elements (*Period* and *Cryptochrome*), suggests that this clock gene seems not to be a direct target for the orexin input to the clock. However it is possible that the observed transient increase of *Per* genes could produce a phase shift that finally would affect other clock genes. In fact, it has been shown that scheduled feeding cues were able to synchronize *Bmal1* expression in liver of a marine teleost, the sea bream (*Sparus aurata*) [50]. In mammals, *Bmal1* expression was reduced in forebrain of orexin neuron ablated mice [2].

The post-injection times studied in the present work (1 and 3 h) seem to be enough time intervals to observe the possible orexin effects. In fact, besides the *Per* genes induction, orexin also stimulated the expression of NPY in the hypothalamus and ghrelin in the foregut of goldfish. As previously mentioned, interactions between orexin and other orexigenic peptides have been previously described in fish, and present results support them. The NPY, one of the most powerful orexigenic peptide described in goldfish [27] increases its expression in the hypothalamus after an acute ICV orexin administration, as in previous studies in this teleost [53], and in the orange spotted grouper [56]. In agreement with such regulation of the NPY system by orexins it has been shown in

rodents a large number of orexin axons in direct synaptic contact with cells that secrete NPY [19]. Present results showed by first time in fish that the acute ICV orexin treatment produced a pronounced increment of ghrelin mRNA (~12-fold at 1 h post-injection) in the goldfish foregut that disappeared 3 h later. This is in agreement with the orexin-induced increase of diencephalic ghrelin (2.5-fold) previously described in this species [29], and demonstrates that the interaction between these two peptides takes place not only into the hypothalamus, but there is also a brain-gut communication. Besides, since previous reports showed that the orexigenic role of ghrelin in goldfish may be mediated by the orexin [29,46], present results also support bidirectional interactions between orexin and ghrelin in fish, as in mammals [24,45].

Daily rhythms in locomotor activity can be considered as an output of the circadian system in the goldfish, and its entrainment by environmental factors, as LD cycle and feeding time has been previously described [5,15,41]. It is well known that scheduled feeding generates a FAA independently of photoperiodic conditions in this species [5,15,40]. Since food intake is the key entry for FAA it is reasonable to expect that food related peptides would be involved in FAA development. The role of orexin on activity in fish has been studied in zebrafish, where a weak effect on wake consolidation and sleep regulatory action is reported [3,38,58]. However, to date no reports exist on the possible role of orexin as an endogenous signal for the entrainment of locomotor activity rhythms in fish. Present results show for the first time that orexin administration during 4-days entrains a significant 24 h rhythm of locomotor activity in fasted goldfish and in absence of a LD cycle. Moreover, a significant increase of locomotor activity in absence of zeitgebers is observed 1 h before the orexin administration (after the second day of orexin injection) which was not found in control fish. Then, we suggest that orexin might mediate the locomotor activity entrainment by food schedule in goldfish, in agreement with the observed changes in clock genes expression induced by this peptide. This hypothesis is supported by the fact that daily locomotor activity rhythms were maintained for two days after the last orexin injection in goldfish under 24L and fasting conditions, indicating that significant activity rhythms are not only due to direct effects of orexin on locomotor activity previously described in fish [3,30,38,58]. Results in mammals also support a role of orexin in the FAA behavior. Restricted feeding in rodents shifts the peak of *Fos* expression in orexin neurons to the feeding time [2], and it has been proved that orexin neurons are essential to the wakefulness state that precedes FAA activity, which was dumped in orexin neuron ablated animals [2,28]. In fact, it has been suggested that the increase in the appetite and feeding behavior induced by orexin might be a consequence of increased locomotion, and the primary role of orexin might be to initiate and maintain the arousal state that precedes feeding [8]. Presents results in fish pointed to the involvement of orexin in the entrainment of FAA also in these vertebrates. However, the generation system of FAA in fish is probable redundant, resultant of more than one signal, as occurs in mammals [17,39]. Thus, when a potent external zeitgeber is present (LD cycle and/or food scheduled) such putative synchronizer effect of orexin cannot be observed, as occurred in the present study in both, scheduled fed animals and under 12L:12D photoperiod. In accordance with this idea it is known that FAA diminished but do not disappear in orexin neuron ablated mice [2,28].

The reward system has been suggested as a potent synchronizer [9,23], and orexin seems to be related to this system in mammals [14,37]. Food seeking behavior in previously conditioned animals is related with the activation of orexin neurons [18], and the reward effect of a high fat diet ghrelin-induced is orexin dependent in mice [36]. In the present study, we did not investigate if a reward mechanism is involved in the synchronizing effect of orexin, but this

possibility agrees with the higher motivation in foraging observed in orexin injected fish under 24L-randomly fed conditions.

In conclusion, orexin in fish may be an input to the circadian system, acting on targets involved in the orexigenic signalization, as the foregut and the hypothalamus. Present results support the relevance of a functional interaction between central and peripheral feeding regulators and the circadian system in teleosts.

Acknowledgements

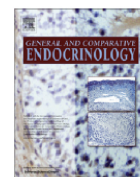
This work has been supported by funds from the Spanish MINECO, AGL2010-22247-C03-02. L. Nisembaum and A. Sánchez-Bretaña are PhD fellowships from Spanish Government (MAEC-AECID and MINECO, respectively).

References

- [1] Abbott M, Volkoff H. Thyrotropin releasing hormone (TRH) in goldfish (*Carassius auratus*): role in the regulation of feeding and locomotor behaviors and interactions with the orexin system and cocaine- and amphetamine regulated transcript (CART). *Horm Behav* 2011;59:236–45.
- [2] Akiyama M, Yuasa T, Hayasaka N, Horikawa K, Sakurai T, Shibata S. Reduced food anticipatory activity in genetically orexin (hypocretin) neuron-ablated mice. *Eur J Neurosci* 2004;20:3054–62.
- [3] Appelbaum L, Wang GX, Maro GS, Mori R, Tovin A, Marin W, et al. Sleep-wake regulation and hypocretin-melatonin interaction in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:21942–7.
- [4] Appelbaum L, Wang G, Yokogawa T, Skariah GM, Smith SJ, Mourrain P, et al. Circadian and homeostatic regulation of structural synaptic plasticity in hypocretin neurons. *Neuron* 2010;68:87–98.
- [5] Aranda A, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ. Influence of light on feeding anticipatory activity in goldfish. *J Biol Rhythm* 2001;16:50–7.
- [6] Azpeleta C, Martínez-Alvarez RM, Delgado MJ, Isorna E, de Pedro N. Melatonin reduces locomotor activity and circulating cortisol in goldfish. *Horm Behav* 2010;57:323–9.
- [7] Azpeleta C, Sánchez-Bretaña A, Isorna E, Nisembaum LG, Velarde E, De Pedro N, et al. Understanding the circadian system as a net of clocks: daily expression of clock genes in the hypothalamus–pituitary–interrenal axis in *Carassius auratus*. In: Delgado MJ, Alonso-Gómez AL, de Pedro N, Isorna E, editors. *Avances en endocrinología comparada*, VI. Servicio de Publicaciones de la Universidad Complutense de Madrid; 2012. p. 37–40.
- [8] Bonnavion P, de Lecea L. Hypocretins in the control of sleep and wakefulness. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2010;10:174–9.
- [9] Challet E, Mendoza J. Metabolic and reward feeding synchronizes the rhythmic brain. *Cell Tissue Res* 2010;341:1–11.
- [10] Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, et al. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:748–53.
- [11] De Pedro N, Alonso-Gómez AL, Gancedo B, Delgado MJ, Alonso-Bedate M. Role of corticotropin-releasing factor (CRF) as a food intake regulator in goldfish. *Physiol Behav* 1993;53:517–20.
- [12] Deurveilher S, Semba K. Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: implications for the circadian control of behavioural state. *Neuroscience* 2005;130:165–83.
- [13] Domínguez L, Morona R, Joven A, González A, López JM. Immunohistochemical localization of orexins (hypocretins) in the brain of reptiles and its relation to monoaminergic systems. *J Chem Neuroanat* 2010;39:20–34.
- [14] Fadel J, Deutch AY. Anatomical substrates of orexin–dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience* 2002;111:379–87.
- [15] Feliciano A, Vivas Y, de Pedro N, Delgado MJ, Velarde E, Isorna E. Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *J Biol Rhythm* 2011;26:24–33.
- [16] Gompf HS, Aston-Jones G. Role of orexin input in the diurnal rhythm of locus coeruleus impulse activity. *Brain Res* 2008;1224:43–52.
- [17] Gunapala KM, Gallardo CM, Hsu CT, Steele AD. Single gene deletions of orexin, leptin, neuropeptide Y, and ghrelin do not appreciably alter food anticipatory activity in mice. *PLoS One* 2011;28:e18377.
- [18] Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 2005;437:556–9.
- [19] Horvath TL, Diano Sabrina, Sotonyi P, Heiman M, Tscho M. Minireview: Ghrelin and the regulation of energy balance – a hypothalamic perspective. *Endocrinology* 2001;142:4163–9.
- [20] Hoskins LJ, Volkoff H. The comparative endocrinology of fish: insights and challenges. *Gen Comp Endocrinol* 2012;176:327–35.
- [21] Hoskins LJ, Volkoff H. Daily patterns of mRNA expression of two core circadian regulatory proteins, Clock2 and Per1, and two appetite-regulating peptides, OX and NPY, in goldfish (*Carassius auratus*). *Comp Biochem Physiol* 2012;163:127–36.
- [22] Idda ML, Bertolucci C, Vallone D, Gothilf Y, Sánchez-Vázquez FJ, Foulkes NS. Circadian clocks: lessons from fish. *Prog Brain Res* 2012;199:41–57.

- [23] Jansen HT, Sergeeva A, Stark G, Sorg BA. Circadian discrimination of reward: evidence for simultaneous yet separable food- and drug-entrained rhythms in the rat. *Chronobiol Int* 2012;29:454–68.
- [24] Kageyama H, Takenoya F, Shiba K, Shioda S. Neuronal circuits involving ghrelin in the hypothalamus-mediated regulation of feeding. *Neuropeptides* 2010;44:133–8.
- [25] Kaslin J, Nystedt JM, Östergård M, Peitsaro N, Panula P. The orexin/hypocretin system in zebrafish is connected to the aminergic and cholinergic systems. *J Neurosci* 2004;11:2678–89.
- [26] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ method. *Methods* 2001;25:402–8.
- [27] López-Patiño MA, Guijarro AI, Isorna E, Delgado MJ, Alonso-Bedate M, DePedro N. Neuropeptide Y has a stimulatory action on feeding behavior in goldfish (*Carassius auratus*). *Eur J Pharmacol* 1999;377:147–53.
- [28] Mieda M, Williams SC, Sinton CM, Richardson JA, Sakurai T, Yanagisawa M. Orexin neurons function in an efferent pathway of a food-entrainable circadian oscillator in eliciting food-anticipatory activity and wakefulness. *J Neurosci* 2004;24:10493–501.
- [29] Miura T, Maruyama K, Shimakura S, Kaiya H, Uchiyama M, Kangawa K, et al. Regulation of food intake in the goldfish by interaction between ghrelin and orexin. *Peptides* 2007;28:1207–13.
- [30] Nakamachi T, Matsuda K, Maruyama K, Miura T, Uchiyama M, Funahashi H, et al. Regulation by orexin of feeding behaviour and locomotor activity in the goldfish. *J Neuroendocrinol* 2006;18:290–7.
- [31] Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 1999;827:243–60.
- [32] Naumann EA, Kampff AR, Prober DA, Schier AF, Engert F. Monitoring neural activity with bioluminescence during natural behavior. *Nat Neurosci* 2010;13:513–20.
- [33] Nisembaum LG, Velarde E, Tinoco AB, Azpeleta C, de Pedro N, Alonso-Gómez AL, et al. Light–dark cycle and feeding time differentially entrains the gut molecular clock of the goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol Int* 2012;29:665–73.
- [34] Noche RR, Lu P-N, Goldstein-Kral L, Glasgow E, Liang JO. Circadian rhythms in the pineal organ persist in zebrafish larvae that lack ventral brain. *BMC Neurosci* 2011;12:7.
- [35] Nuñez A, Rodrigo-Angulo ML, Andrés ID, Garzón M. Hypocretin/orexin neuropeptides: participation in the control of sleep–wakefulness cycle and energy homeostasis. *Curr Neuropharmacol* 2009;7:50–9.
- [36] Perello M, Sakata I, Birnbaum S, Chuang J-C, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, et al. Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol Psychiatry* 2010;67:880–6.
- [37] Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 1998;18:9996–10015.
- [38] Prober DA, Rihel J, Onah AA, Sung RJ, Schier AF. Hypocretin/orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in zebrafish. *J Neurosci* 2006;26:13400–10.
- [39] Ribeiro AC, LeSauter J, Dupré C, Pfaff DW. Relationship of arousal to circadian anticipatory behavior: ventromedial hypothalamus: one node in a hunger-arousal network. *Eur J Neurosci* 2009;30:1730–8.
- [40] Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA, Zamora S, Igo M, Tabata M. Locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: dual and independent phasing. *Physiol Behav* 1996;60:665–74.
- [41] Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA, Zamora S, Tabata M. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding entrainable circadian oscillator. *J Comp Physiol A* 1997;181:121–32.
- [42] Shibahara M, Sakurai T, Nambu T, Takenouchi T, Iwaasa H, Egashira SI, et al. Structure, tissue distribution, and pharmacological characterization of *Xenopus* orexins. *Peptides* 1999;20:1169–76.
- [43] Singletary KG, Deviche P, Strand C, Delville Y. Distribution of orexin/hypocretin immunoreactivity in the brain of a male songbird, the house finch, *Carpodacus mexicanus*. *J Chem Neuroanat* 2006;32:81–9.
- [44] Teske JA, Billington CJ, Kotz CM. Hypocretin/orexin and energy expenditure. *Acta Physiol (Oxf)* 2010;198:303–12.
- [45] Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal M, Shimbara T, et al. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 2003;144:1506–12.
- [46] Unniappan S, Canosa LF, Peter RE. Orexigenic actions of ghrelin in goldfish: feeding-induced changes in brain and gut mRNA expression and serum levels, and responses to central and peripheral injections. *Neuroendocrinology* 2004;79:100–8.
- [47] Unniappan S, Lin X, Cervini L, Rivier J, Kaiya H, Kangawa K, et al. Goldfish ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake. *Endocrinology* 2002;143:4143–6.
- [48] Vatine G, Vallone D, Gothilf Y, Foulkes NS. It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett* 2011;585:1485–94.
- [49] Velarde E, Haque R, Iuvone PM, Azpeleta C, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ. Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus*: cDNA cloning and rhythmic expression of period and cryptochrome transcripts in retina, liver, and gut. *J Biol Rhythm* 2009;24:104–13.
- [50] Vera LM, Negrini P, Zagatti C, Frigato E, Sánchez-Vázquez FJ, Bertolucci C. Light and feeding entrainment of the molecular circadian clock in a marine teleost (*Sparus aurata*). *Chronobiol Int* 2013;30:649–61.
- [51] Volkoff H, Bjorklund JM, Peter RE. Stimulation of feeding behavior and food consumption in the goldfish, *Carassius auratus*, by orexin-A and orexin-B. *Brain Res* 1999;846:204–9.
- [52] Volkoff H, Eykelbosh AJ, Peter RE. Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting. *Brain Res* 2003;972:90–109.
- [53] Volkoff H, Peter RE. Interactions between orexin A, NPY and galanin in the control of food intake of the goldfish, *Carassius auratus*. *Regul Peptides* 2001;101:59–72.
- [54] Wall A, Volkoff H. Effects of fasting and feeding on the brain mRNA expressions of orexin, tyrosine hydroxylase (TH), PYY and CCK in the Mexican blind cavefish (*Astyanax fasciatus mexicanus*). *Gen comp Endocrinol* 2013;183:44–52.
- [55] Xu M, Volkoff H. Molecular characterization of prepro-orexin in Atlantic cod (*Gadus morhua*): cloning, localization, developmental profile and role in food intake regulation. *Mol Cell Endocrinol* 2007;271:28–37.
- [56] Yan A, Zhang L, Tang Z, Zhang Y, Qin C, Li B, et al. Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) orexin: molecular cloning, tissue expression, ontogeny, daily rhythm and regulation of NPY gene expression. *Peptides* 2011;32:1363–70.
- [57] Yokobori E, Kojima K, Azuma M, Kang KS, Maejima S, Uchiyama M, et al. Stimulatory effect of intracerebroventricular administration of orexin A on food intake in the zebrafish, *Danio rerio*. *Peptides* 2011;32:1357–62.
- [58] Yokogawa T, Marin W, Faraco J, Pézeron G, Appelbaum L, Zhang J, et al. Characterization of sleep in zebrafish and insomnia in hypocretin receptor mutants. *PLoS Biol* 2007;5:2379–97.
- [59] Yoshida K, McCormack S, España RA, Crocker A, Scammell TE. Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J Comp Neurol* 2006;494:845–61.
- [60] Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, Ripley B, Matsumura H, Yoneda H, et al. Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light–dark cycle and sleep–wake activities. *Eur J Neurosci* 2001;14:1075–81.

III. RESULTADOS



Crosstalking between the “gut-brain” hormone ghrelin and the circadian system in the goldfish. Effects on clock gene expression and food anticipatory activity.

Laura G. Nisembaum, Nuria de Pedro, María J. Delgado, Esther Isorna*.

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II). Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Circadian system

Clock genes

FAA

FEO

Ghrelin

Locomotor activity

ABSTRACT

Ghrelin is a potent orexigenic signal mainly synthesized in the stomach and foregut of vertebrates. Recent studies in rodents point out that ghrelin could also act as an input for the circadian system and/or as an output of peripheral food-entrainable oscillators, being involved in the establishment of food anticipatory activity (FAA). In goldfish (*Carassius auratus*) it is well known the orexigenic role of ghrelin. In this study we pursue the possible interaction of ghrelin with the circadian system of this teleost. First, we analyzed if ghrelin is able to modulate the core clock functioning by regulating clock gene expression in fish under a light/dark cycle 12L:12D and fed at 10 am. As expected the acute intraperitoneal (IP) injection of goldfish ghrelin (gGRL_[1-19], 44 pmol/g bw) induced the expression of hypothalamic orexin. Moreover, ghrelin also induced (~2 fold) some *Per* clock genes in hypothalamus and liver. This effect was partially counteracted in liver by the ghrelin antagonist [D-Lys³]-GHRP-6, 100 pmol/g bw). Second, we investigated if ghrelin is involved in daily FAA rhythms. With this aim locomotor activity was studied in response to IP injections (5-10 days) of gGRL_[1-19] and [D-Lys³]-GHRP-6 at the doses above indicated. Ghrelin and saline injected fish showed similar 24-h activity patterns. However, ghrelin antagonist treatment abolished the FAA in scheduled fed fish under 24-h light, suggesting the involvement of the endogenous ghrelin system in this pre-feeding activity. Altogether these results suggest that ghrelin could be acting as an input for the entrainment of the food-entrainable oscillators in the circadian organization of goldfish.

1. INTRODUCTION

Ghrelin (GRL) is a peptide identified for the first time by Kojima and co-workers (1999) in rat's stomach. At present it is known that the gastrointestinal tract is the main system for the synthesis of this hormone in vertebrates (Kaiya et al., 2008), although it has been also detected in other peripheral and central locations (Cowley et al., 2003). Particularly in fish, the highest levels of GRL mRNA occur in the stomach and the

foregut, depending on the species (Breves et al., 2009, Kaiya et al., 2003, Parhar et al., 2003, Unniappan et al., 2002). Lower mRNA expression is detected in other peripheral tissues and also in the brain (Amole and Unniappan, 2009, , Piccinetti et al., 2010, Unniappan et al., 2002). Specifically in the fish hypothalamus, the main integration center for food intake regulators (, Kang et al., 2011, Unniappan et al., 2004), ghrelin mRNA has been detected in all studied species, including goldfish (*Carassius auratus*; Jonsson,

III. RESULTADOS

2013) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*; Feng et al., 2013)

The first reported function of GRL was its effect as a growth hormone secretagogue (GHS), stimulating GH release from the pituitary gland (Kojima et al., 1999). Later Subsequent studies identified other functions of GRL, as its orexigenic action,s (Nakazato et al., 2001). Moreover, GRL levels are modified in response to the nutritional state, with Increases in GRL mRNA expression in mice under fasting conditions (Toshinai et al., 2001). In addition, a preprandial rise (Cummings et al., 2001) followed by a postprandial decrease in circulating GRL (Tschop et al., 2001) was also observed in mammals, indicating that ghrelin is a signal of meal initiation. In some fish species, as goldfish and zebrafish (*Danio rerio*), GRL mRNA expression in brain and gut is also modified as GRL serum levelsby the nutritional state, increasing under fasting conditions and decreasing after feeding, (Amole and Unniappan, 2009, Unniappan et al., 2004). In accordance with GRL modifications by feeding status, intracerebroventricular (ICV) and/or intraperitoneal (IP) administration of this hormone usually increases food intake in the studied fish species (Jonsson, 2013). Moreover, an interaction of GRL with central feeding regulators has been shown. Ghrelin is an activator of other orexigenic systems,as the neuropeptide Y (NPY), and orexin in fish (Miura et al., 2006,Miura et al., 2007), suggesting that these peptides could mediate the GRL induced food intake stimulation.

Besides feeding regulation, GRL modifies locomotor activity in a few vertebrate species. Some studies in rodents (Keen-Rhinehart and Bartness, 2005) and goldfish (Kang et al., 2011, Matsuda et al., 2006, Yahashi et al., 2012) show an increment of locomotor activity induced by GRL administration, although a decrease of locomotor activity was also described in rodents (Tang-Christensen et al., 2004), goldfish (Kang et al., 2011, Yahashi et al., 2012) and in chicken (*Gallus gallus*) (Carvajal et al., 2009).

Because of the above mentioned dual role of ghrelin, as a regulator of food intake and locomotor activity, it is proposed that this peptide could be involved in the generation of the food anticipatory activity (FAA), i.e. the increase in locomotor activity observed just 3-4 h before food supply in scheduled fed animals, including goldfish (Sánchez-Vázquez et al., 1997). The FAA is related to food reward (Challet and Mendoza,

2010), and GRL has been also involved in the brain reward circuitry Perello et al., 2010). FAA is controlled by the named food entrainable oscillator (FEO), considered at present as a net of oscillators probably located at both, central and peripheral level (Albrecht, 2012, Escobar et al., 2009). Some studies in mammals have suggested the involvement of GRL in the circadian system. Thus, it could be acting as an output of a FEO located in the oxyntic cells of the stomach in mice (LeSauter et al., 2009), andproduces phase advances in the electric activity and PER2 expression in the suprachiasmatic nucleusexplants of mice (Yannielli et al., 2007). In addition, IP injections of the growth hormone releasing protein-6 (GHRP-6), a synthetic analog of GRL, also induced a phase advance in daily locomotor activity of food deprived animals (Yannielli et al., 2007). The recently demonstrated the activation of hypothalamic neurons by GRL during the FAA in mammals, also supports the role of GRL as a synchronizer of FEOs (van der Plasse et al., 2013).

To date, nothing is known about a possible crosstalking between GRL and the circadian system in fish. Daily rhythms in clock genes expression have been reported in various central and peripheral locations of goldfish, including the liver and the hypothalamus (Feliciano et al., 2011, Nisembaum et al., 2012, Velarde et al., 2009), that also express GRL receptors (Kaiya et al., 2010). Thus, the aim of the present study was to identify the possible role of GRL as an input of the circadian system in goldfish and its relationship with the FAA. First, the acute effects of gGRL_[1-19] and a GRL receptor antagonist [D-Lys³]-GHRP-6 on clock genes (*Per1a*, *Per2a*, *Per3*, *Cry3* and *Bmal1a*) on and hypothalamic food regulators (NPY and orexin) expression was investigated. Second, sub-chronic effects of these GRL agonist and antagonist on daily locomotor activity rhythms were studied.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Acclimation conditions

Goldfish (9.08 ± 0.21 g of body weight (bw) were purchased from a local supplier (ICA, Spain), and maintained in 60-l tanks (n=6-9 fish/tank), with constant flow of filtered water in a temperature-controlled room ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Before starting the experiments, fish were acclimated under a 12

hours light and 12 hours dark photoperiod (12L:12D), with lights onset at 08:00 h, and a scheduled feeding regime at 10:00 h (SF10) with 1% bw for at least 2 weeks. The tanks walls were covered with opaque paper to minimize external interferences during the experiments. All experimental protocols were approved by the Animal Experimentation Committee of Complutense University of Madrid, and comply with current laws in Spain (RD53/2013) and the European Directive 2010/63/EU.2.2. *Drugs and intraperitoneal injections*

For the IP injections fish were anesthetized in water containing tricaine methanesulphonate (MS-222, 0.1 g/l, Sigma Chemical, Madrid, Spain). Immediately after loss of equilibrium, fish were weighed and injected using 1 ml syringes and 0.3 mm Microlance needles (Lab-Center, Spain), close to the ventral midline posterior to the pelvic fins. All animals were injected with 10 μ l/g bw of teleost saline (20 mg Na₂CO₃ per 100 ml of 0.6% NaCl) alone or containing the drugs. Ghrelin (gGRL_[1-19], Ser-(decanoyl³)-Ghrelin-19-goldfish-acetate, Bachem, Switzerland) (44 pmol/g bw) and the ghrelin antagonist [D-Lys³]-GHRP-6, (BACHEM, Switzerland) (100 pmol/g bw) were IP injected. The doses were chosen based on previous reports in goldfish (Kaiya et al., 2010, Miura et al., 2007, Unniappan et al., 2004) and summer flounder (*Paralichthys dentatus*; Breves et al., 2009). After the injections, fish were transferred to anaesthetic-free water where swimming activity and equilibrium was recovered within 1–2 min.

2.3. Effect of GRL on clock genes, orexin-A, and NPY expression.

Four groups of fish (under 12L:12D and SF10) received two sequential IP injections separated by 10 min: (1) control group that received two injections of teleost saline; (2) GRL group, injected with teleost saline followed by gGRL_[1-19]; (3) GRL antagonist group, injected with [D-Lys³]-GHRP-6 followed by teleost saline; and (4) antagonist plus GRL group, injected with [D-Lys³]-GHRP-6 followed by gGRL_[1-19]. Fish were injected at midday (14:00 h, ZT 6). At 1 and 3 hours post-injection fish (n=7/group and sampling time) were anesthetized, sacrificed and. hypothalamus, pituitary and liver were quickly sampled and stored at -80°C until used. Clock gene expression was quantified in the three

collected tissues, and orexin and NPY expression was also analyzed in the hypothalamus.

2.4. Effect of GRL and GRL antagonist on locomotor activity rhythms.

Firstly, goldfish (n=7-9 fish/tank, 6 tanks) acclimated for two weeks as above described were food deprived for 5 days, and under these conditions, they were IP injected with teleost saline (control fish, 3 tanks), or with gGRL_[1-19] (GRL treated fish, 3 tanks). Locomotor activity was continuously recorded before, during, and after injections. At the end of injection period, animals were still food deprived for 4 days in order to observe the putative maintenance of a rhythmic activity.

Secondly, four tanks of fish (n=6-9 fish/tank) were maintained for 17 days under constant light (24L) and randomly fed twice in 24-h (each time with 1% bw). Under such conditions, the daily locomotor activity rhythm was lost. Then, a scheduled feeding protocol at 16:00 h was initiated to induce a FAA. Under these conditions, goldfish were IP injected at 13:00 h during 10 days with teleost saline (control fish, 2 tanks) or with a GRL antagonist ([D-Lys³]-GHRP-6 group, 2 tanks). Locomotor activity was continuously recorded before, during, and after treatment to analyze the effect of the GRL antagonist on the FAA. At the end of the injection period, animals were food deprived for 4 days in order to observe the putative maintenance of the possible FAA.

2.5. Gene expression analysis by Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Total RNA from goldfish tissues was extracted with Trizol (TRI® Reagent method, Sigma Chemical, Madrid, Spain) and treated with DNase (Promega, Madison, USA) at 37°C for 40 min to eliminate genomic DNA. Then, 0.5 μ g of RNA was retro-transcribed using the SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA). The mRNA expression of clock genes (*gPer1a*, *gPer2a*, *gPer3*, *gCry3* and *gBmall*) the two orexigenic hormones, orexin (OX) and NPY, was quantified by qRT-PCR in a CFX96TM Real-Time System (Biorad Laboratories, Hercules, USA). PCR reactions were performed in a 20 μ l final volume using 10 μ l iTaqTM SYBR® Green Supermix (Biorad Laboratories, Hercules, USA), specific primers (0.4 μ M; Sigma Chemical, Madrid, Spain; see Table 1) and 1 μ l cDNA. The protocol for measuring mRNA expressions was: 1

III. RESULTADOS

cycle at 95°C for 3 min and 40 cycles consisting in 95°C for 10 s, 58°C for 30 s and 72°C for 45 s, for the three *Per* genes and *gCry3*, varying the annealing temperature for *gBmalla* (55°C), *gOx* (65°C), *gNpy* (64°C) and for β -actin expression (60°C), the last one used as reference gene. All samples were analyzed in duplicated and the relative mRNA expression was determined by the $\Delta\Delta C_t$ method (Livak and Schmittgen, 2001), represented by fold change. The efficiency of the amplification for all genes studied was around 100%. The specificity of the amplification reactions was confirmed by the melting temperature in each sample and by the size of the obtained PCR products in an agarose gel.

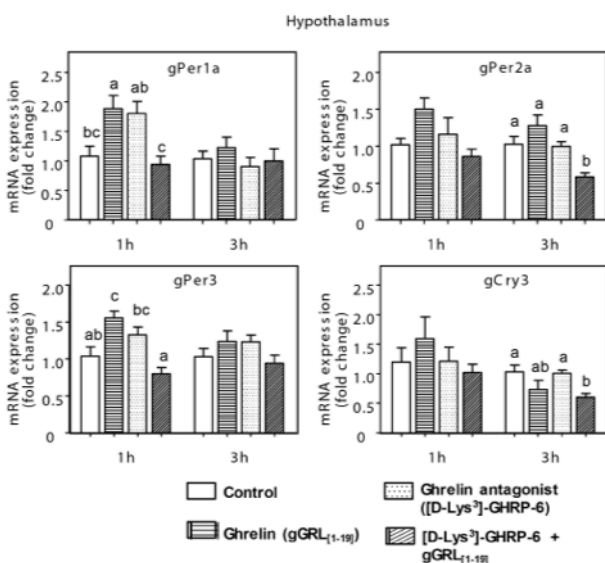


Figure 1. Expression of clock genes (*gPer1a*, *gPer2a*, *gPer3*, *gCry3*) in hypothalamus of goldfish maintained under 12L:12D photoperiod, SF10 and injected at 14:00 h. Data are shown in relative units ($\Delta\Delta C_t$ method), as the mean \pm standard error (n=6/7), 1 and 3 h post-injection. Different letters indicate differences among the groups (SNK, $p < 0.05$).

2.6. Recording of locomotor activity

Locomotor activity was recorded by using infrared photocells (OMRON E3S-AD12, Japan) fixed on different parts of the aquaria wall (one under the food dispenser in the upper, one in the center of the aquaria wall, and one at the bottom). Each photocell continuously emitted an infrared light beam, which was interrupted each time fish swam in that zone, generating an output signal. The number of light beam interruptions was automatically counted and stored every 10 min by specific software (Micronec, Spain). The locomotor activity recorded was analyzed and represented as actograms and periodograms obtained with the chronobiology software “*El temps*®”.

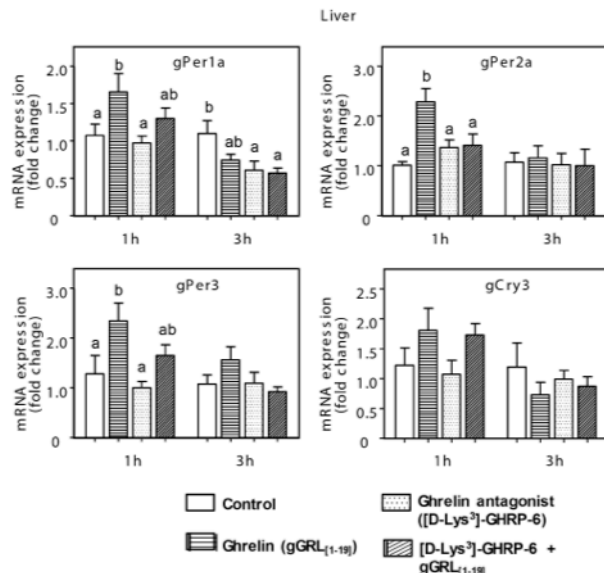


Figure 2. Expression of clock genes (*gPer1a*, *gPer2a*, *gPer3*, *gCry3*) in liver of goldfish maintained under 12L:12D photoperiod, SF10 and injected at 14:00 h. Data are shown in relative units ($\Delta\Delta C_t$ method), as the mean \pm standard error (n=6/7), 1 and 3 h post-injection. Different letters indicate differences among the groups (SNK, $p < 0.05$).

2.7. Statistics

The statistical analysis were performed using the Statgraphics software (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, version 5.1.) Statistical differences in gene expression among the different sampling times were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a posthoc (Student Newman Keuls, SNK). In the case of *gPer2a* and *gBmalla* in liver, and *gOx* in hypothalamus, values were transformed (logarithmic transformation) to obtain a normal distribution and homogeneity of variances. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Effects of GRL and GRL antagonist on clock genes, orexin-A, and NPY expression.

The acute treatment with gGRL₁₋₁₉ induced the expression of the three *Per* clock genes in the hypothalamus and liver of goldfish (around 2-3 fold; Fig. 1 and Fig. 2), but not in the pituitary (data not shown), while *gCry3* (Fig. 1 and Fig. 2) and *gBmala* (Fig. 3) were not affected by the IP injection of this peptide. This *Per* induction was observed only at 1 h, but not at 3 h post-injection. In the hypothalamus, *gPer1a* and *gPer3a* increased with gGRL₁₋₁₉ injection, while *gPer2a* showed an increment but not statistically significant. The increase of *gPer1a* and *gPer3a*

III. RESULTADOS

expression levels in $gGRL_{[1-19]}$ treated fish was counteracted by the treatment with the ghrelin antagonist [D-Lys³]-GHRP-6, (Fig. 1). However, a tendency (but not statistically significant) to induce *Per* genes can be observed in fish treated with the GRL antagonist. The expression of *gCry3* in the hypothalamus was not modified at any time of treatment, except at 3-h after the double treatment [D-Lys³]-GHRP-6 and $gGRL_{[1-19]}$ when the expression was lower than in the control group (Fig. 1). In the liver, the induction of *Per* genes caused by $gGRL_{[1-19]}$ injection was partially blocked by the antagonist [D-Lys³]-GHRP-6, and, contrary to the hypothalamus, the antagonist by itself had no effect on the expression of these genes (Fig. 2). The *gCry3* expression was not modified by any treatment neither at 1 nor at 3-h post-injection (Fig. 2).

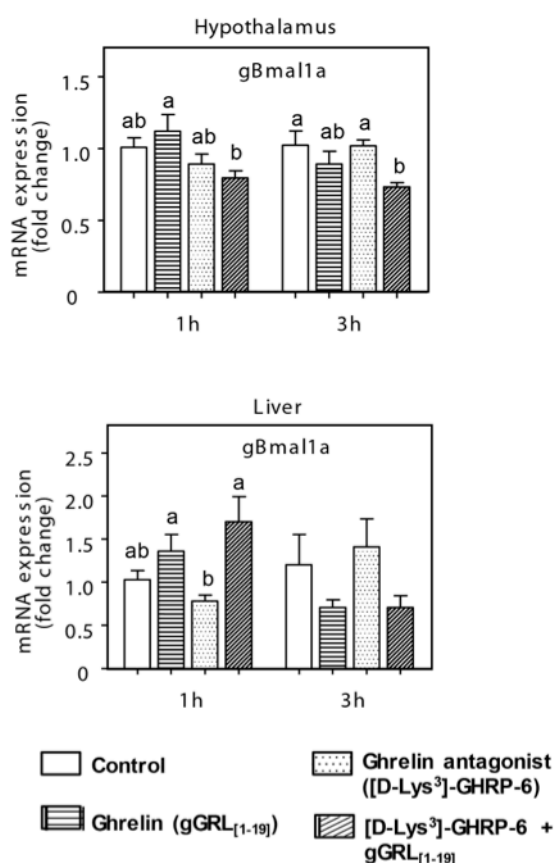


Figure 3. Expression of *gBmal1a* in hypothalamus and liver of goldfish maintained under 12L:12D photoperiod, SF10 and injected at 14:00 h. Data are shown in relative units ($\Delta\Delta Ct$ method), as the mean \pm standard error ($n=6/7$), 1 and 3 h post-injection. Different letters indicate differences among the groups (SNK, $p<0.05$).

In both, hypothalamus and liver, the expression of *gBmal1a*, was not modified by GRL at any times post-injection (Fig. 3). The antagonist [D-Lys³]-GHRP-6 by itself does not affect *gBmal1a* expression but this expression

decreased in the hypothalamus at 3-h after the double treatment with $gGRL_{[1-19]}$ and its antagonist (Fig. 3).

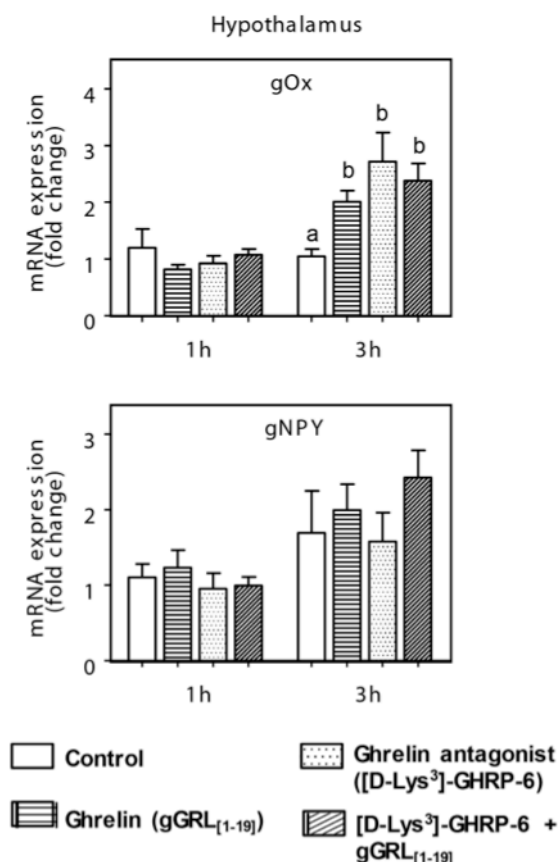


Figure 4. Expression of feeding regulators *gOx* and *gNpy* in the hypothalamus of goldfish maintained under 12L:12D photoperiod, SF10 and injected at 14:00 h. Data are shown in relative units ($\Delta\Delta Ct$ method), as the mean \pm standard error ($n=6/7$), 1 and 3 h post-injection. Different letters indicate differences among the groups (SNK, $p<0.05$).

The Figure 4 shows the effects of GRL and the GRL antagonist on feeding regulators expression. The $gGRL_{[1-19]}$ increased (2-fold) the expression of orexin in the hypothalamus at 3-h post-injection, but not before. The [D-Lys³]-GHRP-6 by itself alone and together with $gGRL_{[1-19]}$ induced a similar stimulation to that induced by the agonist. The NPY expression was not modified by any treatment neither at 1 nor at 3-h post-injections (Fig. 4).

3.2. Effects of GRL and GRL antagonist on locomotor activity daily rhythms.

The IP sub-chronic treatment with $gGRL_{[1-19]}$ was used to investigate its putative role as an endogenous synchronizer signal that generates a locomotor anticipatory activity similar to the FAA. In the first experiment, under 12L:12D photoperiod and fasting conditions, both groups

III. RESULTADOS

(saline and gGRL_[1-19] injected) showed a 24-h locomotor activity rhythm, with a period around 24 h (Fig. 5). During the 4 days post-injection, the anticipatory activity remained with a periodicity around 24-h in all tanks of gGRL_[1-19] injected fish (3 tanks, data not shown), in contrast to the control group, that any tank maintained such 24-h period (Fig. 5). In the second experiment, under 24L conditions and scheduled fed at 16:00-h, fish injected with [D-Lys³]-GHRP-6 at 13:00 h did not show a FAA (Fig. 6). The control group exhibited a FAA seven days after the scheduled feeding regime. These daily activity profiles accords with their periodograms, which indicated a 24-h significant rhythm only in the control group. The locomotor activity in food deprived fish during the 4 days after the injection period showed a periodicity around 24-h in the control group, indicating a maintenance of the FAA. By contrast, the period of the daily activity profile in the [D-Lys³]-GHRP-6 injected group was not statistically significant (Fig. 6).

4. DISCUSSION

4.1. Interaction between GRL and clock genes

Present results shows for the first time in

vertebrates that GRL is able to induce clock gene expression at central (hypothalamus) and peripheral (liver) locations. The acute induction of *gPer1a*, *gPer2a* and *gPer3* genes by gGRL_[1-19] suggest that physiological changes in endogenous GRL could alter the clockwork in these tissues. GRL could modify the sensitivity of these oscillators to ulterior inputs, and to a lesser extent to promote phase shifts. It is well documented that a direct light induction of *per2* in zebrafish is the mechanism by which clock gene rhythms are synchronized to the LD cycle in this species (Vatine et al., 2011). This also occurs for other hormones that are candidates to act as “internal zeitgebers” in some mammalian species (Albrecht, 2012, Dickmeis et al., 2013). The most studied are glucocorticoids that in mammals synchronize peripheral oscillators (Dickmeis et al., 2013,) probably via *Per1* induction (Yamamoto et al., 2005).

Interestingly it seems that the family of *Per* genes are usually the targets of different synchronizing molecules in mammals (Oike et al., 2011). This could be also the case in goldfish. Besides the GRL induction of *Per* genes (present results), changes in *Per* gene expression by orexin

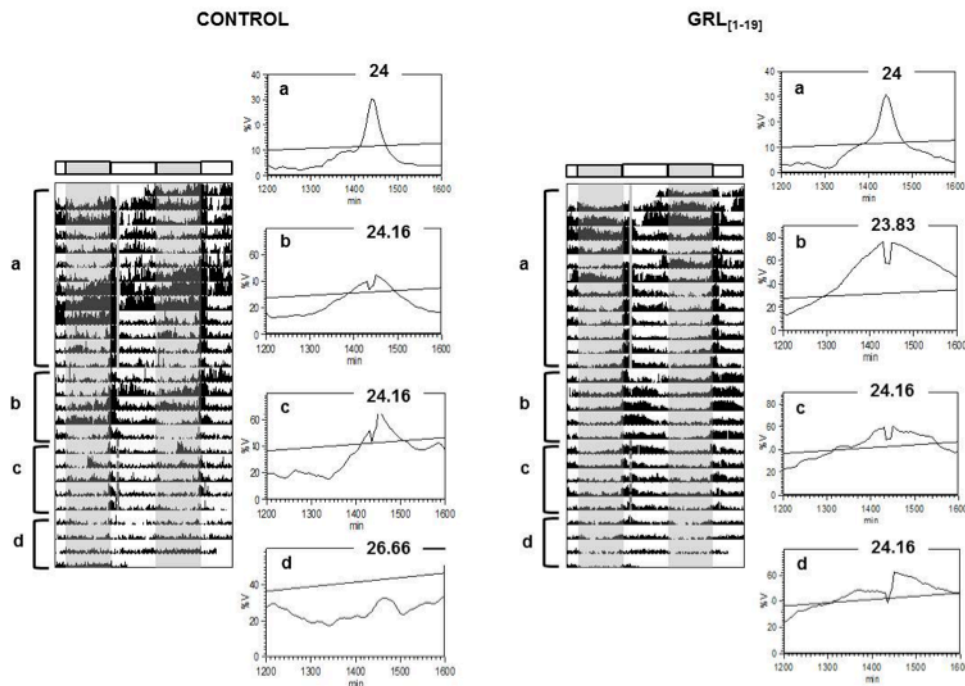


Figure 5. Representative actograms of locomotor activity of control and gGRL_[1-19] treated goldfish maintained under 12L:12D photoperiod and the following experimental conditions: SF10 (a); fasting (b); injection at 10:00 h under fasting conditions (c); and fasting after injection period (d). The grey squares indicate the dark phase of the photocycle. The continuous line indicates the feeding time and the dashed line indicates the injection time. Actograms are double plotted (48 h time scale). Peaks over the threshold line in the periodogram indicate a significant rhythm. The period value of each condition is represented on the top of each periodogram.

(Nisembaum et al., 2013), cortisol (*unpublished own results*), light (*Per2a*; Azpeleta, 2012; Velarde et al., 2009), and food (Nisembaum et al., 2012) have been also reported in goldfish. Moreover, in this teleost daily rhythms in *Per* transcripts have higher amplitudes than other clock genes (particularly *Per1* and *Per3*; Feliciano et al., 2011, Nisembaum et al., 2012, Velarde et al., 2009). In the present study, neither *gCry3* (other gene from the negative loop) nor *gBmal1a* (a gene from the positive loop of the molecular clock) were modified by GRL treatment, indicating that GRL effect is specific for *Per* family clock genes, and support the proposal that *Per* genes are more sensitive to the environmental regulation than other clock genes, and thus, they probably are targets for different inputs to the goldfish circadian system. It is known that *gPer2a* expression is induced by light in goldfish central tissues, but not in peripheral ones (Azpeleta, 2012, Feliciano et al., 2011, Velarde et al., 2009), where it is more sensitive to feeding cues (Feliciano et al., 2011, Nisembaum et al., 2012). This fact could explain the significant stimulation of *gPer2a* expression in the liver, but not in the hypothalamus. Similarly, a different response of *gPer2a* in foregut and hypothalamus after orexin ICV administration has been also reported in goldfish (Nisembaum et al., 2013), reinforcing the different tissue sensitivity of this gene to external

signals (Azpeleta, 2012, Feliciano et al., 2011, Nisembaum et al., 2013). The lack of changes in clock genes expression in the pituitary by GRL seems indicate that the effects of GRL on this gland are rather related with gonadotrophins stimulation (Grey et al., 2010, Unniappan and Peter, 2004) than to the FEO mechanism.

The effects of GRL on clock genes expression in liver are probably mediated by specific GRL receptors since they are counteracted by a GRL antagonist. Three of the four described subtypes of GRL receptors are functional in goldfish (GHS-R1a-1, GHS-R1a-2, GHS-R2a-1) with differential tissue distribution (Kaiya et al., 2010). Both GHS-R1 subtypes are expressed in higher levels in liver than in the diencephalon, while GHS-R2a-1 is highly expressed in the diencephalon and not detected in liver of goldfish (Kaiya et al., 2010). This distribution could explain the different effects induced by the ([D-Lys³]-GHRP-6) in the hypothalamus and the liver in the present study. The surprisingly induction of PER and orexin by the GRL antagonist in the hypothalamus needs to be clarified, but it agrees with recent results in chicken where a similar double effect of [D-Lys³]-GHRP-6 has been described, i.e. [D-Lys³]-GHRP-6 acts by itself as an agonist while its combination with GRL counteracts GRL effects (Sirotkin et al., 2013).

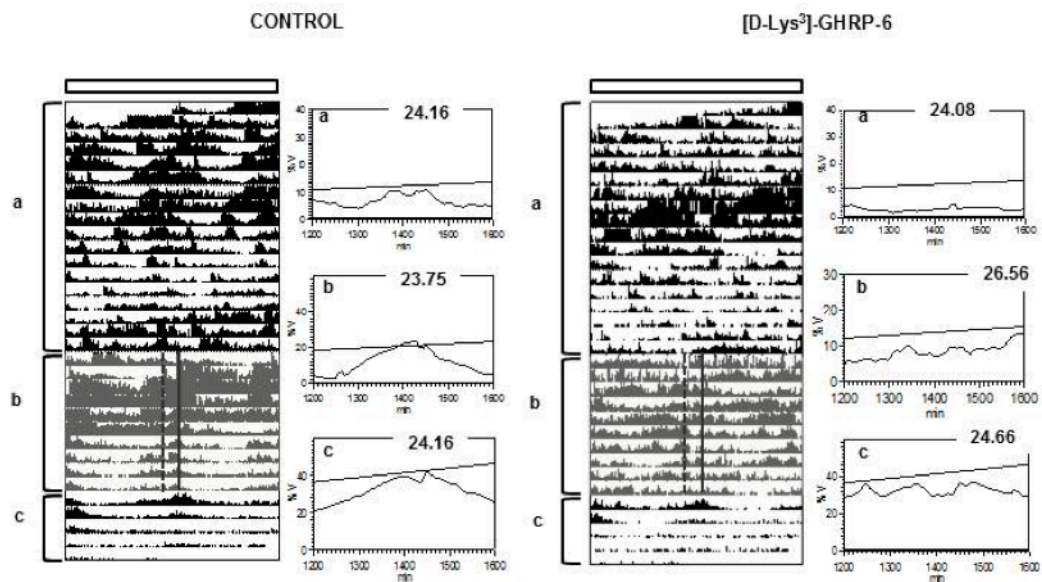


Figure 6. Representative actograms of locomotor activity of control and ghrelin receptors antagonist [D-Lys³]-GHRP-6 treated goldfish maintained under 24L and the following experimental conditions: Random feeding twice a day (a); injection at 13:00 h and scheduled feeding at 16:00 h (b); and fasting after injection period (c). The continuous line indicates the feeding time and the dashed line indicates the injection time. The white square indicates the injection period. Actograms are double plotted (48 h time scale). Peaks over the threshold line in the periodogram indicate a significant rhythm. The period value of each condition is represented on the top of each periodogram.

III. RESULTADOS

4.2. Crosstalking among central and peripheral feeding regulators

The expected increase in hypothalamic orexin transcripts by the IP administration of GRL in the present study demonstrates the effectiveness of gGRL_[1-19] treatment, and supports the existence of a crosstalking among peripheral and central orexigenic signals in this teleost, as previously suggested (Miura et al., 2007, Nisembaum et al., 2013). Besides orexin induction, it is reported that central, but not peripheral, GRL administration induces NPY mRNA expression at 2-h post-injection (Miura et al., 2006). The lack of effect of GRL on NPY mRNA expression in goldfish hypothalamus (present results) are in agreement with those from Miura and coworkers, and confirms such central regulatory effects of GRL.

This crosstalking between central and peripheral areas involved in the food intake control could be also important in the interaction of feeding regulators with the circadian system. Besides the *Per* induction by GRL showed here, it was recently reported the induction of some *Per* genes by orexin in the goldfish hypothalamus and the foregut at 3-h post-injection, but not before (Nisembaum et al., 2013). A possible interaction between both orexigenic peptides (orexin and GRL) for the stimulation of hypothalamic *Per* expression cannot be excluded, since IP injected GRL increases hypothalamic orexin expression (present results), similar to the effect of ICV GRL injections described in goldfish diencephalon (Miura et al., 2007). In this sense, orexin ICV injected also increases GRL expression in goldfish foregut (Nisembaum, et al., 2013).

4.3. Effect of GRL on daily locomotor activity rhythms

The sub-chronic treatment with the GRL antagonist prevent the FAA under a scheduled feeding protocol and 24L conditions, supporting the involvement of GRL in the establishment of FAA in goldfish. Under such environmental conditions, saline injected goldfish exhibited a marked anticipatory activity, as expected (Feliciano et al., 2011, Sánchez-Vázquez et al., 1997). This is the first report in fish that involves GRL in the FAA, as it was suggested in mammals based on the reduction in duration or amplitude of FAA in GRL-R knock-out mice (Blum et al., 2009, LeSauter et al., 2009). However, the specific requirement of GRL to allow the FAA is not clear to date. In fact, recent reports demonstrated that GRL-R knock-out mice were

able to anticipate restricted feeding time under 24L conditions (Lamont et al., 2013).

In the presence of LD lighting conditions, fasted goldfish exhibited 24-h locomotor activity rhythms when injected with GRL. However, this activity rhythm cannot be totally ascribed to GRL since under a LD cycle goldfish tends to increase their activity during the light phase (Iigo and Tabata, 1996), as it is observed in control group (present study) that also exhibited daily activity rhythms with periods close to 24-h. Nevertheless, it cannot be discarded that control goldfish (saline-injected) had increased circulating GRL, since it is reported that several days fasting increases GRL expression in peripheral and central tissues in fish (Amole and Unniappan, 2009, Unniappan et al., 2004). Besides, tissue sensitivity to GRL could be enhanced during food deprivation, as up-regulation of GRL receptors under fasting conditions has been shown in mammals (Nogueiras et al., 2004, Tups et al., 2004) and fish (Zhang et al., 2008; Kaiya et al., 2010), suggests that the.

Present study was planned to avoid the influence of food (first experiment, fasting conditions) and L/D photocycle (second experiment under 24L) as synchronizing cues, since previous studies shown that the effectiveness of exogenous GRL or its agonist GHRP-6 is better observed when other potent *zeitgebers* are absent (mice, Yanielli et al., 2007; brown trout, *Salmo trutta*, Tinoco et al., 2013). This could be in agreement with the consideration of the FEO in mammals as a net of redundant systems, with the interaction of central and peripheral signals (Albrecht, 2012, Escobar et al., 2009) from which humoral signals could be influencing timing mechanism in food-entrained brain areas (Carneiro and Araujo, 2009, Carneiro and Araujo, 2012). This proposal could be also adequate in fish, where a less hierarchical circadian system is probably present (Feliciano et al., 2011, Noche et al., 2011), and central and peripheral oscillators are synchronized by food and LD cycle (Feliciano et al., 2011; Nisembaum et al., 2012). In fact, orexin in goldfish also promotes daily activity rhythms in the absence of other inputs (Nisembaum et al., 2013), suggesting that the FEO is also organized under a redundant net of signals. Finally, the involvement of the reward system in FAA, that also includes orexigenic hormones such as ghrelin and orexin (Patton and Mistlberger, 2013) remains to be elucidated in fish.

In conclusion, the present study shows an interaction between GRL and the circadian system in goldfish. GRL could be an input of the circadian system acting as an entraining signal of feeding status.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by the Spanish MINECO (AGL2010-22247-C03-02). L. Nisembaum is PhD fellowship from Spanish Government (MAEC-AECID).

5. REFERENCES

Albrecht, U., 2012. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* 74, 246-260.

Amole, N., Unniappan, S., 2009. Fasting induces preproghrelin mRNA expression in the brain and gut of zebrafish, *Danio rerio*. *Gen Comp Endocrinol.* 161, 133-137.

Azpeleta, C., Isorna, E., Nisembaum, L.G., Velarde, E., De Pedro, N., et al. 2012. Understanding the circadian system as a net of clocks: daily expression of clock genes in the hypothalamus-pituitary-interrenal axis in *Carassius auratus*. In: Delgado MJ, Alonso-Gómez AL, de Pedro N and Isorna E, (Eds). *Avances en Endocrinología Comparada Vol VI. Servicio de Publicaciones de la Universidad Complutense de Madrid*; pp.37-40.

Blum, I.D., Patterson, Z., Khazall, R., Lamont, E.W., Sleeman, M.W., Horvath, T.L., et al., 2009. Reduced anticipatory locomotor responses to scheduled meals in ghrelin receptor deficient mice. *Neuroscience* 164, 351-359.

Breves, J.P., Veillette, P.A., Specker, J.L., 2009. Ghrelin in the summer flounder: immunolocalization to the gastric glands and action on plasma cortisol levels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 152, 268-272.

Carneiro, B.T., Araujo, J.F., 2009. The food-entrainable oscillator: a network of interconnected brain structures entrained by humoral signals? *Chronobiol. Int.* 26, 1273-1289.

Carneiro, B.T., Araujo, J.F., 2012. Food entrainment: major and recent findings. *Front. Behav. Neurosci.* 6, 83.

Carvajal, P., Carlini, V.P., Schioth, H.B., de Barioglio, S.R., Salvatierra, N.A., 2009. Central ghrelin increases anxiety in the open field test and impairs retention memory in a passive avoidance

task in neonatal chicks. *Neurobiol. Learn. Mem.* 91, 402-407.

Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschop, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., et al., 2003. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649-661.

Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., Weigle, D.S., 2001. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714-1719.

Challet, E., Mendoza, J., 2010. Metabolic and reward feeding synchronises the rhythmic brain. *Cell Tissue Res.* 341, 1-11.

Dickmeis, T., Weger, B.D., Weger, M., 2013. The circadian clock and glucocorticoids--interactions across many time scales. *Mol. Cell. Endocrinol.* 380, 2-15.

Escobar, C., Cailotto, C., Angeles-Castellanos, M., Delgado, R.S., Buijs, R.M., 2009. Peripheral oscillators: the driving force for food-anticipatory activity. *Eur. J. Neurosci.* 30, 1665-1675.

Feliciano, A., Vivas, Y., de Pedro, N., Delgado, M.J., Velarde, E., Isorna, E., 2011. Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *J. Biol. Rhythms* 26, 24-33.

Feng, K., Zhang, G.R., Wei, K.J., Xiong, B.X., 2013. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogenetic expression of ghrelin and regulation of expression by fasting and refeeding in the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* 319, 202-212.

Grey, C.L., Grayfer, L., Belosevic, M., Chang, J.P., 2010. Ghrelin stimulation of gonadotropin (LH) release from goldfish pituitary cells: presence of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) and involvement of voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *Mol. Cell. Endocrinol.* 317, 64-77.

Hastings, M., O'Neill, J.S., Maywood, E.S., 2007. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol.* 195, 187-198.

Iigo, M., Tabata, M., 1996. Circadian rhythms of locomotor activity in the goldfish *Carassius auratus*. *Physiol. Behav.* 60, 775-781.

Jonsson, E., 2013. The role of ghrelin in energy balance regulation in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 187, 79-85.

Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L.G., Hirano, T., Grau, E.G., et al., 2003. Amidated fish ghrelin: purification, cDNA

III. RESULTADOS

cloning in the Japanese eel and its biological activity. *J. Endocrinol.* 176, 415-423.

Kaiya, H., Miura, T., Matsuda, K., Miyazato, M., Kangawa, K., 2010. Two functional growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) type 1a and 2a in goldfish, *Carassius auratus*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 327, 25-39.

Kaiya, H., Miyazato, M., Kangawa, K., Peter, R.E., Unniappan, S., 2008. Ghrelin: a multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 149, 109-128.

Kang, K.S., Yahashi, S., Matsuda, K., 2011. The effects of ghrelin on energy balance and psychomotor activity in a goldfish model: an overview. *Int. J. Pept.* 2011, 171034.

Keen-Rhinehart, E., Bartness, T.J., 2005. Peripheral ghrelin injections stimulate food intake, foraging, and food hoarding in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol. . Integr. Comp. Physiol.* 288, R716-R722.

Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., Kangawa, K., 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656-660.

Lamont, E.W., Bruton, J., Blum, I.D., Abizaid, A., 2013. Ghrelin receptor-knockout mice display alterations in circadian rhythms of activity and feeding under constant lighting conditions. *Eur J Neurosci.* doi: 10.1111/ejn.12390

LeSauter, J., Hoque, N., Weintraub, M., Pfaff, D.W., Silver, R., 2009. Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 13582-13587.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

Matsuda, K., Miura, T., Kaiya, H., Maruyama, K., Shimakura, S., Uchiyama, M., et al., 2006. Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelin in the goldfish. *Peptides* 27, 2321-2325.

Matsuda, K., Miura, T., Kaiya, H., Maruyama, K., Uchiyama, M., Kangawa, K., et al., 2006. Stimulatory effect of n-octanoylated ghrelin on locomotor activity in the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides* 27, 1335-1340.

Miura, T., Maruyama, K., Kaiya, H., Miyazato, M., Kangawa, K., Uchiyama, M., et al., 2009. Purification and properties of ghrelin from the intestine of the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides* 30, 758-765.

Miura, T., Maruyama, K., Shimakura, S., Kaiya, H., Uchiyama, M., Kangawa, K., et al., 2006. Neuropeptide Y mediates ghrelin-induced

feeding in the goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci. Lett.* 407, 279-283.

Miura, T., Maruyama, K., Shimakura, S., Kaiya, H., Uchiyama, M., Kangawa, K., et al., 2007. Regulation of food intake in the goldfish by interaction between ghrelin and orexin. *Peptide.* 28, 1207-1213.

Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., et al., 2001. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409, 194-198.

Nisembaum, L.G., de Pedro, N., Delgado, M.J., Sánchez-Bretaña, A., Isorna, E., 2013. Orexin as an input of circadian system in goldfish: effects on clock gene expression and locomotor activity rhythms. *Peptides.* doi: 10.1016/j.peptides.2013.11.014.

Nisembaum, L.G., Velarde, E., Tinoco, A.B., Azpeleta, C., de Pedro, N., Alonso-Gomez, A.L., et al., 2012. Light-dark cycle and feeding time differentially entrains the gut molecular clock of the goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol. Int.* 29, 665-673.

Noche, R.R., Lu, P.N., Goldstein-Kral, L., Glasgow, E., Liang, J.O., 2011. Circadian rhythms in the pineal organ persist in zebrafish larvae that lack ventral brain. *BMC Neurosci.* 12, 7.

Nogueiras, R., Tovar, S., Mitchell, S.E., Rayner, D.V., Archer, Z.A., Dieguez, C., et al., 2004. Regulation of growth hormone secretagogue receptor gene expression in the arcuate nuclei of the rat by leptin and ghrelin. *Diabetes* 53, 2552-2558.

Oike, H., Nagai, K., Fukushima, T., Ishida, N., Kobori, M., 2011. Feeding cues and injected nutrients induce acute expression of multiple clock genes in the mouse liver. *PLoS One* 6, e23709.

Parhar, I.S., Sato, H., Sakuma, Y., 2003. Ghrelin gene in cichlid fish is modulated by sex and development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 169-175.

Patton, D.F., Mistlberger, R.E., 2013. Circadian adaptations to meal timing: neuroendocrine mechanisms. *Front. Neurosci.* 7, 185.

Perello, M., Sakata, I., Birnbaum, S., Chuang, J.C., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S.A., et al., 2010. Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol. Psychiatry* 67, 880-886.

Pezuk, P., Mohawk, J.A., Wang, L.A., Menaker, M., 2012. Glucocorticoids as entraining

signals for peripheral circadian oscillators. *Endocrinology* 153, 4775-4783.

Piccinetti, C.C., Migliarini, B., Olivotto, I., Coletti, G., Amici, A., Carnevali, O., 2010. Appetite regulation: the central role of melatonin in *Danio rerio*. *Horm. Behav.* 58, 780-785.

Sánchez-Vázquez, F.J., Madrid, J.A., Zamora, S., Tabata, M., 1997. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding-entrainable circadian oscillator. *J. Comp. Physiol. A* 181, 121-132.

Sirotkin, A.V., Pavlova, S., Tena-Sempere, M., Grossmann, R., Jimenez, M.R., Rodriguez, J.M., et al., 2013. Food restriction, ghrelin, its antagonist and obestatin control expression of ghrelin and its receptor in chicken hypothalamus and ovary. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 164, 141-153.

Tang-Christensen, M., Vrang, N., Ortmann, S., Bidlingmaier, M., Horvath, T.L., Tschop, M., 2004. Central administration of ghrelin and agouti-related protein (83-132) increases food intake and decreases spontaneous locomotor activity in rats. *Endocrinology* 145, 4645-4652.

Tinoco, A.B., Naslund, J., Delgado, M.J., de Pedro, N., Johnsson, J.I., Jonsson, E., 2013. Ghrelin increases food intake, swimming activity and growth in juvenile brown trout (*Salmo trutta*). *Physiol. Behav.* 124, 15-22.

Toshinai, K., Mondal, M.S., Nakazato, M., Date, Y., Murakami, N., Kojima, M., et al., 2001. Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 1220-1225.

Tschop, M., Wawarta, R., Riepl, R.L., Friedrich, S., Bidlingmaier, M., Landgraf, R., et al., 2001. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J. Endocrinol. Invest.* 24, 19-21.

Tups, A., Helwig, M., Khoroshii, R.M., Archer, Z.A., Klingenspor, M., Mercer, J.G., 2004. Circulating ghrelin levels and central ghrelin receptor expression are elevated in response to food deprivation in a seasonal mammal (*Phodopus sungorus*). *J. Neuroendocrinol.* 16, 922-928.

Unniappan, S., Canosa, L.F., Peter, R.E., 2004. Orexigenic actions of ghrelin in goldfish: feeding-induced changes in brain and gut mRNA expression and serum levels, and responses to central and peripheral injections. *Neuroendocrinology* 79, 100-108.

Unniappan, S., Lin, X., Cervini, L., Rivier, J., Kaiya, H., Kangawa, K., et al., 2002. Goldfish

ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake. *Endocrinology* 143, 4143-4146.

Unniappan, S., Peter, R.E., 2004. In vitro and in vivo effects of ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone release in goldfish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286, R1093-R1101.

Van der Plasse, G., Merkestien, M., Luijendijk, M.C., Van der Roest, M., Westenberg, H.G., Mulder, A.B., et al., 2013. Food cues and ghrelin recruit the same neuronal circuitry. *Int. J. Obes. (Lond.)* 37, 1012-1019.

Vatine, G., Vallone, D., Gothilf, Y., Foulkes, N.S., 2011. It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett.* 585, 1485-1494.

Velarde, E., Haque, R., Iuvone, P.M., Azpeleta, C., Alonso-Gomez, A.L., Delgado, M.J., 2009. Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus*: cDNA cloning and rhythmic expression of period and cryptochrome transcripts in retina, liver, and gut. *J. Biol. Rhythms* 24, 104-113.

Yahashi, S., Kang, K.S., Kaiya, H., Matsuda, K., 2012. GHRP-6 mimics ghrelin-induced stimulation of food intake and suppression of locomotor activity in goldfish. *Peptides* 34, 324-328.

Yamamoto, T., Nakahata, Y., Tanaka, M., Yoshida, M., Soma, H., Shinohara, K., et al., 2005. Acute physical stress elevates mouse period1 mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. *J. Biol. Chem.* 280, 42036-42043.

Yannielli, P.C., Molyneux, P.C., Harrington, M.E., Golombek, D.A., 2007. Ghrelin effects on the circadian system of mice. *J. Neurosci.* 27, 2890-2895.

Zhang, Y., Liu, Y., Huang, X., Liu, X., Jiao, B., Meng, Z., et al., 2008. Two alternatively spliced GPR39 transcripts in seabream: molecular cloning, genomic organization, and regulation of gene expression by metabolic signals. *J. Endocrinol.* 199, 457-470.

III. RESULTADOS

Capítulo II

FUNCIONALIDAD DE ENZIMAS DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE MELATONINA (AANAT Y HIOMT): CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS ISOFORMAS DE LA AANAT Y FUNCIONES ALTERNATIVAS EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL DEL CARPÍN (*Carassius auratus*).

- 2.2. *Neurochemistry International* **2013**; 62:873-80.
- 2.3. *Neurogastroenterology and motility* **2014**; (*Enviado*).

2.1. FUNCIONALIDAD DE ENZIMAS DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE MELATONINA (AANAT Y HIOMT): CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS ISOFORMAS DE LA AANAT.

Resumen

Varios estudios han sugerido que el TGI puede ser origen de parte de la melatonina circulante, en base a su presencia en el TGI y a la detección de algunas enzimas de su ruta biosintética o de su expresión génica. Sin embargo, esta cuestión de la síntesis intestinal de melatonina permanece sin resolver, dadas las características físico-químicas de la indolamina, como se indicó en la sección de introducción de esta Memoria, y la aún inexistente demostración directa de dicha biosíntesis. En esta capítulo nos propusimos investigar mediante una aproximación directa esta hipotética biosíntesis de melatonina en el TGI del carpín, para lo cual diseñamos un estudio de la actividad funcional *in vitro* de las dos últimas enzimas de la ruta biosintética, la AANAT y HIOMT en hígado e intestino analizando sus posibles cambios diarios. Además, conociendo la expresión diferencial de ambas isoformas de la AANAT, un objetivo adicional ha sido identificar la isoforma funcional predominante en el TGI del carpín y realizar un estudio comparado de sus características cinéticas con las de la isoforma de la retina.

La actividad AANAT se ha analizado en muestras de intestino anterior, intestino posterior, hígado y retina (esta última como control positivo de producción de melatonina) recogidas cada 3 h durante un ciclo completo de 24 h, cuantificando la producción de N-acetiltriptamina *in vitro* en presencia de triptamina y acetil coenzima-A. La actividad HIOMT se ha cuantificado mediante la producción de melatonina *in vitro* en presencia de N-acetilserotonina y S-(5'-adenosyl)-L-metionina. Los productos formados en ambas reacciones enzimáticas (N-acetiltriptamina y melatonina) se han cuantificado con HPLC y detección de fluorescencia. Nuestro estudio demuestra una actividad enzimática AANAT funcional en el intestino anterior, posterior y en el hígado del carpín, con fluctuaciones a lo largo de un ciclo de 24h, siendo esta oscilación de carácter rítmico únicamente en el intestino anterior y en la retina, con acrofases durante la fase oscura ($ZT\ 15,9 \pm 1,3$ y $19,2 \pm 0,4$ en intestino anterior y retina, respectivamente) del fotociclo diario. Sin embargo, la actividad funcional de la última de las enzimas de la ruta biosintética de melatonina, la HIOMT, sólo se detecta en la retina, pero no en las localizaciones del TGI investigadas. Este

III. RESULTADOS

estudio demuestra, por primera vez en el carpín, una oscilación rítmica diaria significativa de la actividad HIOMT en la retina, con la acrofase situada 1 hora después de la acrofase del ritmo de la AANAT. En el hígado y en el intestino posterior no se encuentra una actividad HIOMT funcional *in vitro*, con lo que se descarta la posibilidad de que exista una síntesis local de melatonina en estos órganos periféricos del carpín. Su presencia podría justificarse en base a una captación de la indolamina desde la circulación o desde la luz intestinal, pero no a una síntesis local.

Los niveles elevados de actividad AANAT medidos en hígado e intestino, junto a la falta de actividad HIOMT motivaron la caracterización de la isoforma predominante de AANAT en el TGI y la búsqueda de posibles sustratos alternativos para la AANAT. Para ello se han realizado ensayos de competición de sustratos utilizando tiramina (1-140mM) y dopamina (1-100mM) frente a triptamina (0,3mM), cuantificando la producción de N-acetiltryptamina y de N-acetildopamina por HPLC con detección de fluorescencia y coulométrica, respectivamente. Los resultados demuestran esta competencia con la triptamina como sustratos alternativos para la ANAT en la retina y el TGI, pero no en la pineal, como cabe esperar para la isoforma AANAT-1, junto a una robusta capacidad de acetilación de la dopamina por parte de la AANAT en intestino e hígado. De forma complementaria, utilizando inhibidores selectivos de la arilamina-N-acetiltransferasa (ANAT), y de la AANAT (ácido fólico y CoA-S-N-acetyltryptamina, respectivamente) se observa una inhibición total de la producción de N-acetildopamina en el hígado, lo que nos permite proponer a la AANAT-1 como la isoforma funcional en el hígado del carpín, donde puede desempeñar un papel clave en la regulación del contenido de dopamina y N-acetildopamina. Por tanto, en el TGI del carpín, la enzima AANAT (muy probablemente la isoforma AANAT-1) no estaría implicada en la síntesis local de melatonina, sino en funciones alternativas, como la acetilación de la dopamina (véase el esquema de la Figura 11 con los diseños experimentales y principales resultados de esta parte del capítulo II).

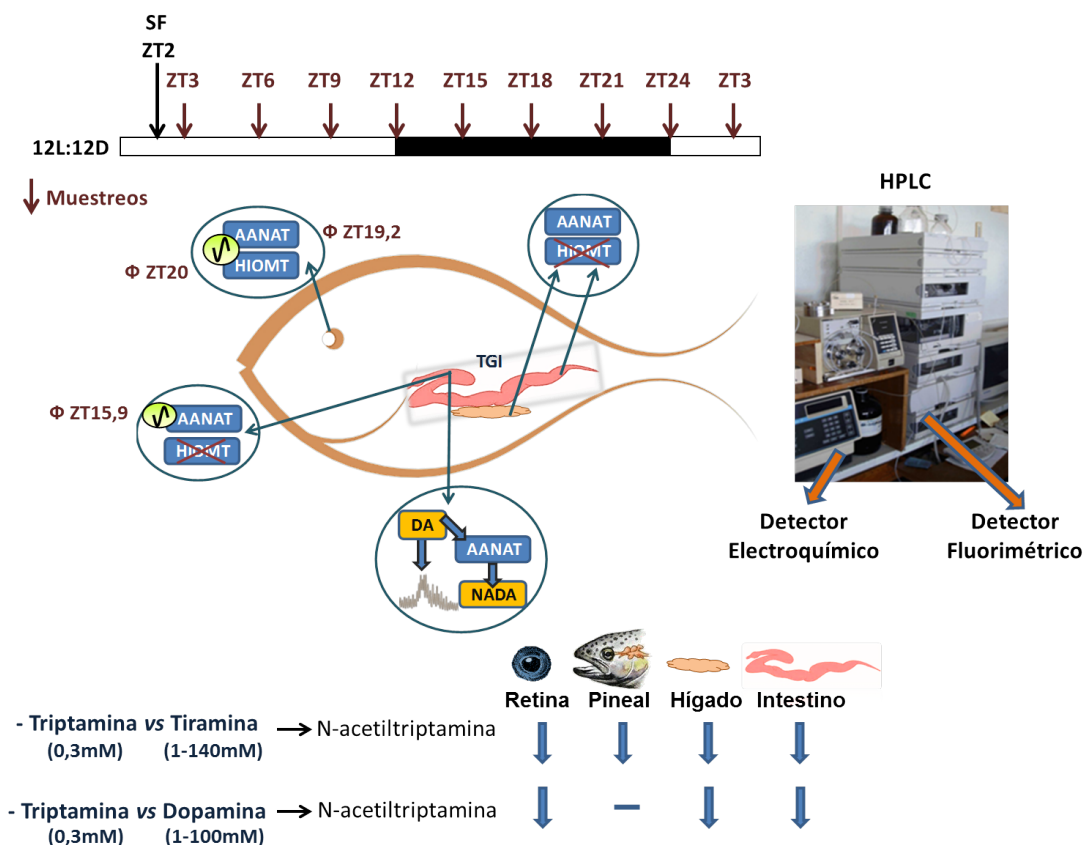


Fig. 11. Esquema del diseño experimental de los principales resultados del apartado 2.2. del Capítulo 2 de Resultados.

2.1.1. FUNCIONES ALTERNATIVAS DE LA AANAT EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL DEL CARPÍN (*Carassius auratus*). EFECTOS EN LA MOTILIDAD INTESTINAL.

Resumen

A partir del hallazgo de la capacidad de acetilación de la dopamina mostrada por la AANAT en el TGI del carpín, nuestro objetivo siguiente ha sido buscar un papel fisiológico para dopamina y N-acetildopamina en el intestino. Conocida la función reguladora de la dopamina en la motilidad intestinal en los mamíferos, utilizamos un sistema de baño de órganos conectado a un transductor isométrico en el que investigar esta posible funcionalidad en los peces. En este sistema *in vitro* la N-acetildopamina no produce ningún efecto sobre la motilidad a ninguna de las concentraciones ensayadas. Por el contrario, el análisis de las curvas concentración/respuesta para la dopamina revela un efecto bifásico, ya que induce contracción intestinal a la concentración más baja (1 μ M), y relajación a altas

III. RESULTADOS

concentraciones (10 y 100 μM). Este interesante y novedoso resultado motivó la caracterización del mecanismo de acción subyacente a dichas acciones.

En primer lugar, se ha determinado la especificidad del efecto relajante preincubando segmentos de intestino anterior con antagonistas generales de receptores dopaminérgicos de los subtipos D_1 y D_2 ($\text{R}(+)\text{SCH23390}$ y domperidona, respectivamente), encontrando que la relajación de la motilidad intestinal inducida por dopamina se bloquea únicamente con el antagonista $\text{R}(+)\text{SCH23390}$, demostrando que este efecto está mediado específicamente por receptores del tipo D_1 . Para descartar la posibilidad de uniones inespecíficas de la dopamina con receptores adrenérgicos, se preincubó el intestino anterior con antagonistas de receptores α - y β -adrenérgicos (yohimbina y propanolol, respectivamente), pudiendo afirmar a partir de los resultados que en la relajación dopaminérgica no están implicados los receptores adrenérgicos. Se ha realizado un estudio de localización de la expresión de los receptores dopaminérgicos en dos capas del intestino del carpín, (mucosa-submucosa, y muscular-serosa), encontrando la presencia de receptores tipo D_1 y D_2 , con una distribución diferencial dependiendo del subtipo de receptor. Esta localización de receptores refuerza los resultados previos que indican una relajación dopaminérgica específica mediada por receptores de tipo D_1 .

A fin de investigar posibles rutas de señalización intracelular implicadas en este efecto relajante de la dopamina, se ha estudiado por un lado la intervención de un potente relajante del músculo liso, el óxido nítrico, y por otro, la cascada de señalización del AMPc y del GMPc. El uso de distintos inhibidores enzimáticos (de la óxido nítrico sintetasa, L-NAME, de la adenilato ciclasa, DDA, y de la guanilato ciclasa, ODQ) nos permite afirmar que la relajación intestinal inducida por dopamina es independiente de óxido nítrico, y no activa las vías de señalización intracelular de AMPc o GMPc. Una posibilidad a descartar es que la dopamina pueda estar interfiriendo con la bien conocida contracción muscular de componente colinérgico, y los ensayos realizados confirman que la dopamina no disminuye el efecto contráctil de la acetilcolina, y además, la pre-incubación con atropina tampoco inhibe la relajación producida por la dopamina, de modo que podemos confirmar que se trata de mecanismos independientes de regulación de la motilidad intestinal.

En este análisis de interacciones entre reguladores de la motilidad, estudiamos el posible efecto de la dopamina en la contracción serotoninérgica (que, en el carpín, se produce en su mayoría por activación de la vía colinérgica). Nuestros resultados muestran

III. RESULTADOS

que la preincubación con dopamina disminuye la contracción serotoninérgica, sugiriendo una posible participación de interneuronas mediando el efecto relajante de la dopamina. Para confirmar esta posibilidad utilizamos tetrodotoxina, bloqueante de canales de sodio dependientes de voltaje, encontrando que no se modifica el efecto de la dopamina en presencia de este potente bloqueante. Por tanto, proponemos que la relajación inducida por dopamina en el intestino anterior del carpín se ejerce directamente sobre receptores de tipo D₁, localizados en células de musculatura lisa intestinal (véase la Figura 12 mostrando un resumen de los diseños experimentales y principales resultados)

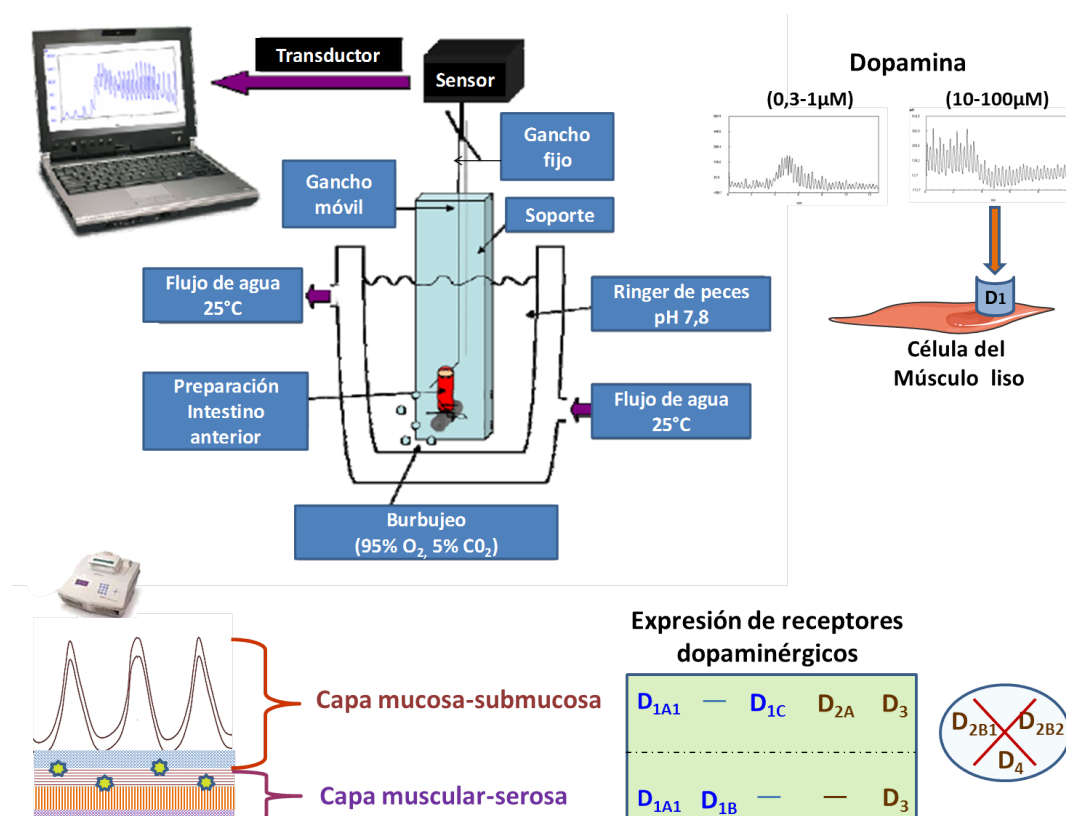


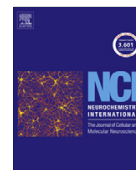
Fig. 12. Diseños experimentales y principales resultados del **apartado 2.2.** del **Capítulo 2.** Sistema de baño de órganos.

III. RESULTADOS



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Neurochemistry International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/nci

The arylalkylamine-N-acetyltransferase (AANAT) acetylates dopamine in the digestive tract of goldfish: A role in intestinal motility

Laura Gabriela Nisembaum^a, A.B. Tinoco^a, A.L. Moure^b, A.L. Alonso Gómez^a, M.J. Delgado^a, A.I. Valenciano^{a,*}

^a Departamento de Fisiología, (Fisiología Animal II) Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Spain

^b Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 October 2012

Received in revised form 24 January 2013

Accepted 22 February 2013

Available online 4 March 2013

Keywords:

AANAT

HIOMT

Dopamine

Melatonin

Liver

Gut

Fish

ABSTRACT

Melatonin has been found in the digestive tract of many vertebrates. However, the enzymatic activity of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AANAT) and the hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT), the last two enzymes of melatonin biosynthesis, have been only measured in rat liver. Therefore, the first objective of the present study is to investigate the functionality of these enzymes in the liver and gut of goldfish, analyzing its possible daily changes and comparing its catalytic properties with those from the retina isoforms. The daily rhythms with nocturnal acrophases in retinal AANAT and HIOMT activities support their role in melatonin biosynthesis. In foregut AANAT activity also show a daily rhythm while in liver and hindgut significant but not rhythmic levels of AANAT activity are found. HIOMT activity is not detected in any of these peripheral tissues suggesting an alternative role for AANAT besides melatonin synthesis. The failure to detect functional HIOMT activity in both, liver and gut, led us to investigate other physiological substrates for the AANAT, as dopamine, searching alternative roles for this enzyme in the goldfish gut. Dopamine competes with tryptamine and inhibits retinal, intestinal and hepatic N-acetyltryptamine production, suggesting that the active isoform in gut is AANAT1. Besides, gut and liver produces N-acetyldopamine in presence of acetyl coenzyme-A and dopamine. This production is not abolished by the presence of folic acid (arylamine N-acetyltransferase inhibitor) in any studied tissue, but a total inhibition occurs in the presence of CoA-S-N-acetyltryptamine (AANAT inhibitor) in liver. Therefore, AANAT1 seems to be an important enzyme in the regulation of dopamine and N-acetyldopamine content in liver. Finally, for the first time in fish we found that dopamine, but not N-acetyldopamine, regulates the gut motility, underlying the broad physiological role of AANAT in the gut.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Melatonin is a well known hormone mainly produced by the pineal and the retina that regulates many rhythmic physiological functions, including gastrointestinal functions (Velarde et al., 2009, 2010b). The biosynthesis of melatonin is under the sequential control of four enzymes. First, tryptophan is transformed into 5-hydroxytryptophan by the tryptophan hydroxylase (E.C. 1.14.16.4). Then, the L-aromatic amino acid decarboxylase (E.C. 4.1.1.28) produces serotonin. The arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT: E.C. 2.3.1.87) converts serotonin into N-acetylsero-

nin, and finally, the hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT: E.C.2.1.1.4) transforms N-acetylserotonin into melatonin (Falcón et al., 2009).

The AANAT is broadly considered as the melatonin rhythm generating enzyme and exhibits a daily rhythm with high nocturnal levels in the pineal and retina of many vertebrates (Klein, 2007). A single AANAT gene has been found in mammals and birds, but the whole genome duplication of ancestral teleosts generated at least two AANAT genes encoding for two different enzymes. The AANAT1 is mostly expressed in the retina, where acetylates several amines, and is involved in multiple local functions. The AANAT2, mainly expressed in the pineal, appears to have acquired a higher selectivity for serotonin to enhance the efficiency of melatonin production (Zilberman-Peled et al., 2011). The enzymatic activity and circadian rhythmic profile of HIOMT was early described in the pineal gland, retina and Harderian gland of some mammals (Nowak et al., 1993) and in the retina of fish (Gern et al., 1984). Later, its mRNA expression has been reported in pineal and retina

Abbreviations: AANAT, arylalkylamine-N-acetyltransferase; ANAT, arylamine-N-acetyltransferase; DA, dopamine; NADA, N-acetyldopamine; HIOMT, hydroxyindole-O-methyltransferase.

* Corresponding author. Address: Departamento de Fisiología, (Fisiología Animal II) Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, C/José Antonio Nováis 2, 28040 Madrid, Spain. Fax: +34 913944935.

E-mail address: aivalenciano@bio.ucm.es (A.I. Valenciano).

0197-0186/\$ - see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2013.02.023>

III. RESULTADOS

874

L.G. Nisembaum et al. / Neurochemistry International 62 (2013) 873–880

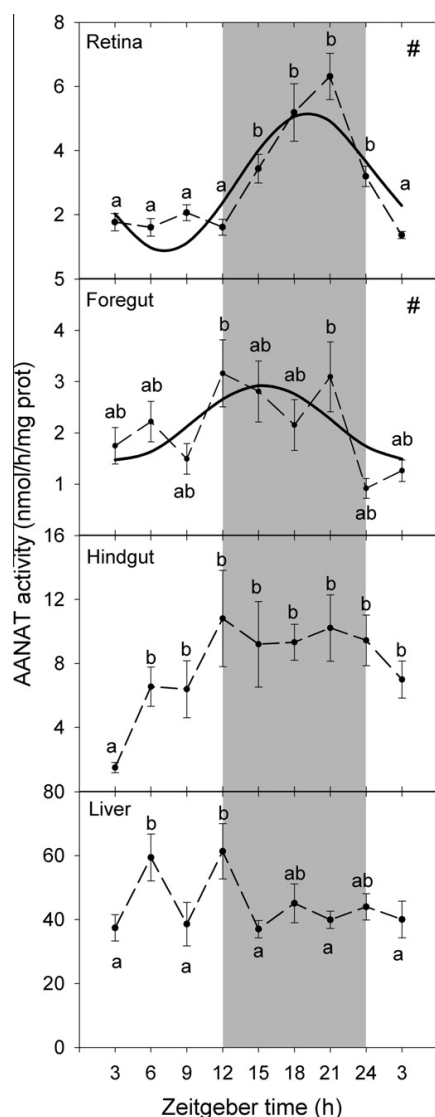


Fig. 1. Daily AANAT activity during a 24 h cycle in goldfish retina, foregut, hindgut and liver. Data are represented as mean \pm SEM ($n = 8$). Different letters indicate significant differences (ANOVA, $p < 0.05$). Solid lines represent the periodic sinusoidal functions adjusted to experimental data when the rhythms are significant (#). Gray area indicates darkness.

of mammals (Pévet et al., 1980), birds (Bernard et al., 1999), and fish (Velarde et al., 2010a).

Melatonin is present in the gut of many vertebrates, including fish (Bubenik and Pang, 1997; Kulczykowska et al., 2006). Some studies emphasize the local synthesis of melatonin in the gastrointestinal tract based on the existence of high expression levels of its synthesizing enzymes (Fernández-Durán et al., 2007; Stefulj et al., 2001). However, functional studies about AANAT and HIOMT activities have only been performed in rat liver (Sánchez-Hidalgo et al., 2009). In goldfish, the gene expression of AANAT1, AANAT2 and HIOMT in liver and gut has been recently reported (Velarde et al., 2010a, 2013), but the functionality of these two key enzymes producing melatonin in these tissues remains to be demonstrated.

Then, our first objective was to investigate the functionality of these two key enzymes, AANAT and HIOMT, in the liver and gut of goldfish, analyzing its possible daily changes and comparing its catalytic properties with those from pineal and retinal isoforms.

The role of dopamine (DA) in the gastrointestinal tract is supported by immunohistochemical studies that demonstrate the presence of DA-containing neurons and dopaminergic receptors in the myenteric plexus of mice (Li et al., 2004, 2006), and by functional studies on dopamine effects on gastrointestinal motility in rat (Kirschstein et al., 2009). Present results showing a broad capability of AANAT in the acetylation of amines in the gut and liver of goldfish. However, we do not find functional HIOMT in these two tissues. This fact encouraged us to investigate the possible acetylation of DA by the AANAT looking for alternative roles for this enzyme in the liver and gut. Finally, we used an organ bath system to test the physiological relevance of DA in the goldfish gut.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Goldfish (*Carassius auratus*) were purchased from a local supplier in Madrid (Spain) and maintained as previously described (Velarde et al., 2009) for at least two weeks before assays. The acclimation conditions at the laboratory were 12 h light and 12 h dark (12L:12D), lights on at 8:00 h, and daily feeding time at 10:00 h (zeitgeber time 2). The experiments were approved by the Animal Experimentation Committee of Complutense University, and were carried out in accordance with the European Communities Council Directive (2010/63/UE).

2.2. Chemicals

N-acetyltryptamine, acetyl coenzyme-A, tryptamine, tyramine, S-(5'-adenosyl)-L-methionine, N-acetylserotonin, folic acid, melatonin, DA and acetylcholine were purchased for Sigma Aldrich Chemicals (Madrid, Spain). N-acetyldopamine (NADA) was synthesized at the Department of Organic Chemistry of Autónoma University of Madrid. CoA-S-acetyltryptamine was obtained from the National Institute of Mental Health's Chemical Synthesis and Drug Supply Program. All drugs were prepared fresh before use.

2.3. In vitro enzymatic assays

2.3.1. Quantification of tryptamine acetylation

The AANAT activity was assayed *in vitro* based on the method by Alonso-Gómez et al. (1992) with some modifications. Briefly, gut and liver tissues were sonicated in five volumes per gram of wet tissue, and retinas in 300 μ L of assay buffer (10 mM EGTA in 0.25 M sodium phosphate, pH 6.5). The homogenates were centrifuged at 16,000g during 10 min at 4 °C. Reactions were carried out during 20 min at 25 °C in a total volume of 100 μ L consisting of 25 μ L of supernatant from homogenates, 0.3 mM tryptamine as substrate, and 1 mM acetyl-Coenzyme-A as the acetyl donor. The reaction was stopped by adding 20 μ L of 2 N perchloric acid, centrifuged at 16,000g for 10 min at 4 °C, and the supernatants were placed into HPLC vials. All reactions were done in duplicates. The N-acetyltryptamine formation was quantified by HPLC coupled to a fluorescence detector (HPLC-FD, Agilent 1100, Madrid, Spain) as previously described (Velarde et al., 2013). The mobile phase consisted of 0.125 mM sodium decanesulfonate, 50 mM phosphoric acid, and 12% acetonitrile (vol/vol) adjusted to pH 3.5 with 10 N NaOH.

2.3.2. Quantification of dopamine acetylation

For the study of DA acetylation we used the procedure described in Section 2.3.1 for the assay of AANAT activity, but DA (30 mM) was employed as substrate instead of tryptamine. The NADA produced was quantified by HPLC coupled to an electrochemical detector (HPLC-ED, ESA, Coulochem II, MA, USA). Mobile phase consisted in 10 mM phosphoric acid, 0.1 mM EDTA, 0.4 mM sodium octanesulfonate and 3% acetonitrile (pH 3.1). The electrode voltage for the analytical cell was 200 mV and the flow rate was 1 ml/min. The rest of chromatographic conditions and equipment were the same than for N-acetyltryptamine quantification (Section 2.3.1).

2.3.3. Quantification of N-acetylserotonin methylation

The HIOMT activity was assayed *in vitro*. Retinas were sonicated in 100 μ L, and gut and liver in five volumes of 50 mM sodium phosphate (pH 7.9) per gram of wet tissue. Homogenates were centrifuged at 16,000g during 10 min at 4 °C. Aliquots of supernatants (25 μ L) were incubated during 1 h at 25 °C with 30 μ M N-acetylserotonin and 100 μ M S-(5'-adenosyl)-L-methionine as substrates in a final volume of 100 μ L. The reaction was stopped with 20 μ L of 2 N perchloric acid, centrifuged (16,000g, 10 min, 4 °C) and the supernatants were placed into HPLC vials. The melatonin production was quantified by HPLC-FD, using a C8 Spherisorb 3- μ m reverse-phase analytical column N10280 (Tracer Analytica, Barcelona, Spain). The mobile phase consisted in sodium biphosphate 0.1 M, and 10% acetonitrile (vol/vol), pH 6.5. The wavelengths used for melatonin detection were 280 nm λ_{ex} and 340 nm λ_{em} .

In all cases, the identification of chromatographic peaks by its retention time, and the quantification of the reaction product by the area under the peaks were done using the Clarity Chromatography Station for Windows software (DataApex, Prague, Czech Republic). The enzymatic activity values were normalized by the protein content of the homogenates quantified by the method of Lowry and coworkers (1951).

2.4. AANAT and HIOMT activities in goldfish gut, liver, and retina

For the characterization of the daily pattern of AANAT and HIOMT activities in the gastrointestinal tract and the retina, 72 fish (5.45 ± 0.14 g body weight) were anesthetized by immersion into ice-cold water and sacrificed every 3 h throughout a 24 h-cycle ($n = 8$ /sampling time). The liver, foregut, hindgut and neural retina were immediately removed and stored at -80 °C until use. Sampling during the dark phase was carried out using a dim red light (three lux). Kinetic studies were performed for the characterization of HIOMT activity in retina, gut and liver. The supernatants were incubated for 1 h at 25 °C in the presence of increasing concentrations of N-acetylserotonin (from 1 to 300 μ M) and S-(5'-adenosyl)-L-methionine (100 μ M). Conversely, for S-(5'-adenosyl)-L-methionine kinetics concentrations from 1 to 300 μ M were used in the presence of N-acetylserotonin (30 μ M).

To study the substrates preference of AANAT, supernatants were incubated either at 25 °C for 20 min (liver, foregut, hindgut and retina) or at 20 °C for 1 h (pineal), with a fixed tryptamine concentration (300 μ M) and increasing concentrations of putative alternative substrates. The competitors tested were tyramine (from 1 to 140 mM) and DA (from 1 to 100 mM). Both, the N-acetyltryptamine and NADA production were quantified as above described.

To test the possible involvement of several N-acetyltransferases in the DA acetylation the enzymatic assay was carried out in gut, liver and retina homogenates in the presence of two specific enzymatic inhibitors. We used the folic acid (1 mM) as inhibitor of Arylamine-N-acetyltransferase (ANAT) activity (Ward et al., 1992), and

the CoA-S-acetyltryptamine (10 μ M) for the inhibition of AANAT activity (Hickman et al., 1999).

2.5. Effects of dopamine and N-acetyldopamine on gut motility in goldfish

Goldfish (43.9 ± 1.5 g) were sacrificed 1 h post feeding, the whole gut was rapidly removed and the foregut was prepared and mounted in the organ bath as previously described (Velarde et al., 2009, 2010b). Briefly, segments of proximal intestine (around 1 cm length) were submerged in water-jacketed organ baths containing 10 ml of physiological saline solution at 22 °C and continuously bubbled with a 95% O₂ and 5% CO₂ mixture. Intestinal strips were mounted longitudinally, attached to an isometric force transducer (LCM Systems Ltd., Cibertec, Madrid, Spain). The optimal resting tension was set at 10 mN and the preparations were left for 60 min to reach a steady basal tone before trials. Differences in force (mN) respect to the basal tone were recorded via an amplifier (Pre205, Cibertec, Madrid, Spain) to a PC, using data acquisition software (ADQ2C, CromaNec, Madrid, Spain). For each gut preparation, a first trial with acetylcholine (10 μ M) was done to determine the tissue response and the maximal contraction. After rinsed twice with fresh saline solution to reach a steady baseline, DA (1 μ M) and NADA (1 μ M) were added separately to the organ bath as 100 μ L-aliquots from stock solutions.

2.6. Data analysis and statistics

Statistical differences in AANAT and HIOMT activity among different sampling times were established by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc test (Student-Newman Keuls, SNK). Differences were considered significant when $p < 0.05$. Significant daily (24-h) rhythms in AANAT activity were tested by fitting the data to a sinusoidal function by the least square method as previously described (Nisembaum et al., 2012). The formula used was $f(t) = M + A \cos(t\pi/12 - \phi)$, where $f(t)$ is the enzymatic activity at a given time, mesor (M) is the mean value, A is the sinusoidal amplitude of oscillation, t is time in hours, and ϕ is the acrophase. Non-linear regression allows the estimation of M , A , and ϕ , and their standard errors (SE), based on the residual sum of squares in the least-squares fit (Duggleby, 1981). The time series data were considered to show a 24-h rhythm when ANOVA was significant and by the zero-amplitude test with cosinor analysis. The kinetic constants were estimated by a non-linear adjustment. For hyperbolic kinetics, the method described for Wilkinson (1961) was used. The inhibition by substrates was analyzed by the method of Duggleby (1981). The IC₅₀ values were estimated by using the software Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, USA).

3. Results

3.1. Daily rhythms of AANAT and HIOMT activities in goldfish gut, liver and retina

The Fig. 1 shows the 24 h-daily profiles of AANAT activity in the retina, hindgut, foregut and liver from goldfish. The cosinor analysis revealed significant rhythmic profiles in the retina and the foregut peaking at the dark phase with acrophases at ZT 19.2 and ZT 15.9, respectively (Table 1). The amplitude of the rhythm in the retina was 3-fold higher than in the foregut with similar mesor values in both locations (Table 1). The AANAT activity in liver showed higher values than in the other studied tissues (around one order of magnitude), but without a rhythmic oscillation.

III. RESULTADOS

Table 1
Parameters defining the daily rhythms of AANAT and HIOMT activities in goldfish.

Tissue	AANAT			HIOMT	
	Foregut	Hindgut	Liver	Retina	Retina
Acrophase (ZT)	15.9 ± 1.3	17.0 ± 1.5	9.8 ± 1.9	19.2 ± 0.4	20.0 ± 0.9
Mesor (nmol/h/mg prot)	2.19 ± 0.16	8.21 ± 0.65	44.96 ± 2.09	3.01 ± 0.17	0.36 ± 0.02
Amplitude (nmol/h/mg prot)	0.72 ± 0.22	2.41 ± 0.92	5.5 ± 3.0	2.14 ± 0.25	0.15 ± 0.04
Significance	#*	*	*	#*	#*

All parameters from sinusoidal functions are expressed as the value ± SE. The consistence of a daily rhythm was considered significant when both, the zero-amplitude test (**p* < 0.05), and the ANOVA (**p* < 0.05) were significant.

The assays carried out to test the HIOMT activity in liver and different segments of the gut cannot allow us to quantify this enzymatic activity in these tissues. We could not detect melatonin production after 1 h incubation of foregut samples neither in blanks (containing only the homogenates but not substrates) nor in the reaction tubes (containing homogenates and substrates). In the liver and hindgut similar low levels of melatonin were detected in both, the blanks (8.11 ± 0.36 pmol/mg prot in liver, and 5.19 ± 0.89 pmol/mg prot in hindgut) and the reaction tubes (9.23 ± 0.39 pmol/mg prot in liver, and 4.25 ± 0.23 pmol/mg prot in hindgut). By contrast, high HIOMT activity levels were measured in the goldfish retina. This enzyme exhibits a Michaelis–Menten kinetics respect to S-(5'-adenosyl)-L-methionine (Fig. 2A), and an inhibition by high N-acetylserotonin concentration (K_i around 330 μM, Fig. 2B). Considering the K_M and V_{max} values, it was established 100 μM for S-(5'-adenosyl)-L-methionine and 30 μM for N-acetylserotonin as the optimal assay substrate concentrations. A daily rhythmic profile of HIOMT activity was found by using these optimal assay concentrations, with the highest levels during the dark phase (Fig. 2C), peaking just 1 h later than the AANAT.

3.2. Dopamine acetylation by the AANAT in goldfish liver and gut

The high levels of AANAT activity measured in liver and gut and the lack of measurable HIOMT activity in these tissues, led us to look for alternative substrates (different to indoleamines) for the AANAT in these organs. Then, we used tyramine and DA as alternative substrates to compete with tryptamine in the *in vitro* AANAT assay. The Fig. 3 shows that these two amines inhibited N-acetyltryptamine production in a concentration-dependent manner in liver and gut, with similar IC₅₀ values (in the low millimolar range, Fig. 3). In the retina DA also inhibited N-acetyltryptamine production with an equivalent IC₅₀ value. However, none of the concentrations of DA added to the assay altered the N-acetyltryptamine production by the pineal (Fig. 3B).

To study the possible production of NADA by gut and liver, homogenates were incubated in the presence of DA and acetyl-CoA. At the end of reaction time, a 20 μl aliquot was injected in the HPLC-ED. The retention time of the NADA standard was 16.33 min (Fig. 4), and this peak was clearly resolved from unconsumed DA (retention time 23.5 min).

The kinetic characterization of DA acetylation in liver and hindgut shows that this reaction follows a Michaelis–Menten kinetics, with a similar affinity for DA in both organs (Fig. 5). The DA acetylation in gut is quite lower than in liver (V_{max} values of 8.7 in gut vs. 122 nmol/h/mg prot in liver). The addition of tryptamine to the assay reaction did not modify the apparent V_{max}, but the affinity of the enzyme for DA was highly reduced (27- and 74-fold increases in the apparent K_M in liver and hindgut, respectively), indicating that both amines compete for the same active site in the enzyme. Very similar results were obtained in the foregut, with an apparent K_M value of 16.7 ± 2 mM for DA in presence of tryptamine, suggesting that the kinetics of the enzyme is quite similar

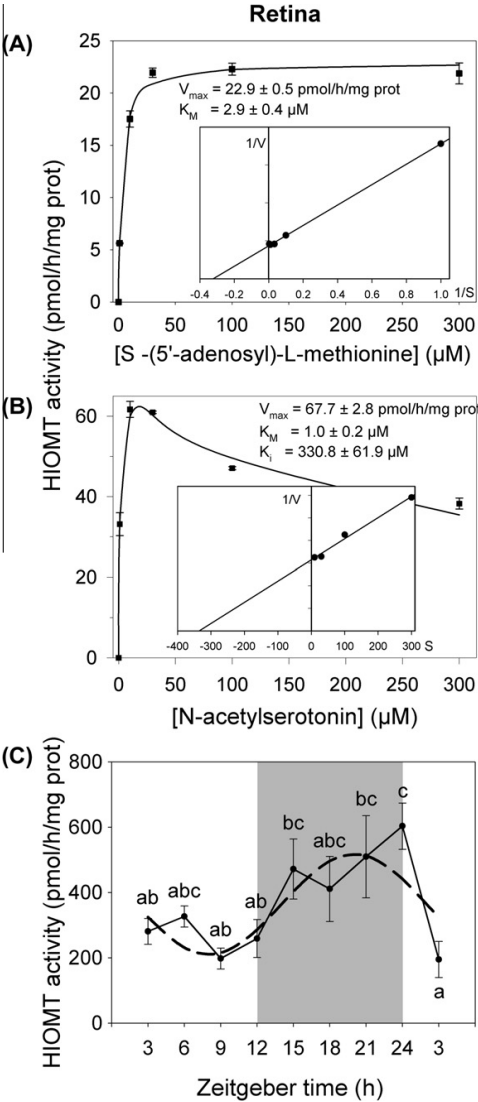


Fig. 2. Kinetic characterization of HIOMT activity in goldfish retina respect to S-(5'-adenosyl)-L-methionine (A) and N-acetylserotonin (B). Kinetic constants were calculated by non-linear regression. Inset graphs depict the Lineweaver–Burk plot for (A) and Dixon plot for (B) illustrating linearity of reciprocal plot. X-axis intercept represents $-1/K_M$ and $-K_i$, respectively. (C) Daily HIOMT activity in the goldfish retina through a 24 h cycle. Data are represented as mean ± SEM (*n* = 8). Different letters indicate significant differences (ANOVA, *p* < 0.05). Dashed line represents the periodic sinusoidal function adjusted to experimental data. Gray area indicates darkness.

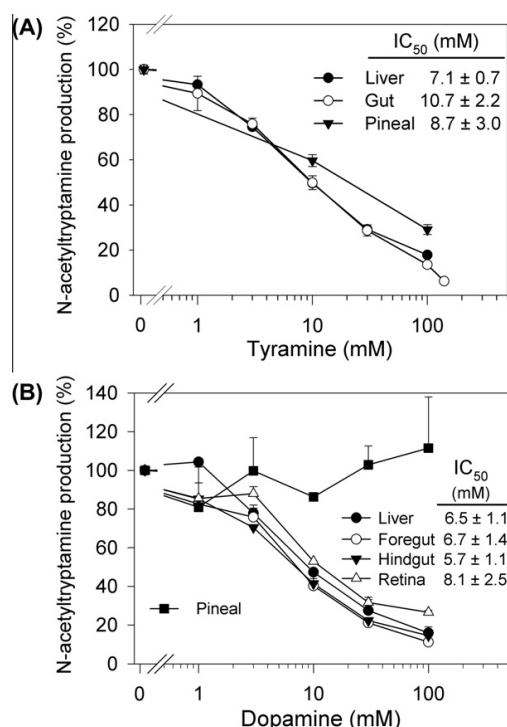


Fig. 3. Competition curves of tyramine (A) and dopamine (B) on AANAT activity in several tissues of goldfish. Tryptamine was added at 300 μ M, acetyl-Coenzyme-A at 1 mM and phenylethylamines from 1 to 140 mM concentrations. Data are represented as the percentage (mean \pm SEM) of enzymatic activity considering the 100% in the absence of inhibitors. IC₅₀ indicates half-maximal inhibitory concentration.

along the gut. However, we do not detect NADA production in retinal extracts.

The addition of folic acid (1 mM) to the liver extracts, as specific inhibitor of ANAT, did not modify DA acetylation, but the addition of 10 μ M CoA-S-acetyltryptamine (specific inhibitor of AANAT) totally abolished the production of NADA (Table 2), indicating that AANAT is the main enzyme involved in DA acetylation in the liver. However, neither the folic acid nor the CoA-S-acetyltryptamine addition had any significant effect on DA acetylation in the gut (Table 2).

3.3. Effects of dopamine and N-acetyldopamine on gut motility in goldfish

The possible role of DA and NADA in the regulation of gut motility was investigated in an *in vitro* model of isolated intestine. The addition of DA (1 μ M) to the organ bath induced a significant contraction of the intestinal strips (3.5-fold increase of force respect to the resting myogenic activity, Fig. 6A). However, the addition of NADA at the same concentration did not modify the resting spontaneous myogenic rhythmic activity (Fig. 6B). This differential response of gut preparation to both amines is summarized in percentage in Fig. 6C, where it can be observed the significant contractile effect of DA in the goldfish intestine.

4. Discussion

Present data demonstrate for the first time the functional activity of AANAT in liver and gut of a teleost. In both tissues, this en-

zyme does not seem to be mainly related with local melatonin synthesis, but with others functions as DA metabolism. Present results also demonstrate that in goldfish retina, AANAT and HIOMT activities are functional, with very similar daily rhythmic pattern. The daily rhythms in both enzymatic activities exhibit nocturnal acrophases, in coincidence with the ocular melatonin rhythm previously described in this teleost (Iigo et al., 1997). Besides, the fact that retina homogenates does not produce detectable levels of NADA under our optimal assay conditions supports that the main role of AANAT activity in this tissue is melatonin biosynthesis. This conclusion agrees with the well characterized daily rhythm of ocular AANAT activity in most of vertebrates so far studied (Iuvone et al., 1999; Besseau et al., 2006; Zilberman-Peled et al., 2006) that overlaps with the daily profiles of ocular MEL content. Studies on ocular HIOMT activity are scarce, and in most species, HIOMT activity remains unchanged through the 24-h cycle (Gern et al., 1984; Nowak et al., 1993; Zawilska et al., 2006). In fish, ocular HIOMT activity has been studied only in trout (Gern et al., 1984) and goldfish (present results), with very similar kinetics respect to S-(5'-adenosyl)-L-methionine in both teleosts, and different kinetics respect to N-acetylserotonin (a Michaelis-Menten kinetics in trout versus an inhibition by substrate in goldfish).

Present results on HIOMT characterization and rhythmicity in retina validate the reported *in vitro* assay as an adequate method to detect and quantify the functionality of this enzymatic activity in goldfish tissues. By using this assay we did not detect significant levels of functional HIOMT activity in goldfish liver nor in gut, in spite of the high levels of AANAT activity detected in both organs. Thus, all these results do not support a local synthesis of melatonin in the digestive tract of goldfish. In fact, the presence of melatonin, the existence of the *aanat* gene expression, and even its functional enzymatic activity does not guarantee the local production of this methoxyindoleamine, since the O-methylation of the N-acetylserotonin by HIOMT is required. To date, the presence of functional HIOMT activity in liver has been only reported in rats, where the enzymatic activity levels (200 pmol/h/mg prot) are of the same order of magnitude than those found for AANAT (Sánchez-Hidalgo et al., 2009). Some classical studies detected melatonin in the gastrointestinal tract (for review see Bubenik, 2008), but its presence does not necessarily demonstrate an endogenous biosynthesis due to its highly lipophilic nature that allows an easy diffusion from bloodstream. In goldfish, an early report described that pinealectomy and blinding abolished the daily rhythm of plasma melatonin, but diurnal values remained unaltered (Kezuka et al., 1992), suggesting that circulating melatonin during daytime has extrapineal/extraocular origin. Pinealectomy markedly reduced melatonin

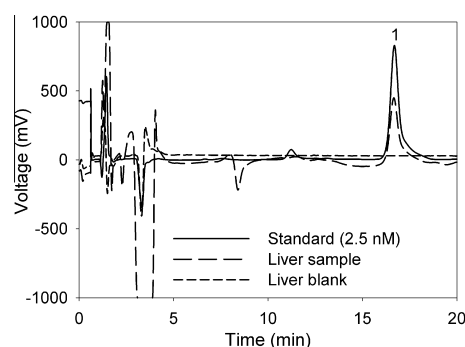


Fig. 4. Representative chromatograms obtained using a standard solution of 2.5 nM NADA (—), a liver sample after the enzymatic assay (---), and a blank where substrates and liver extract are added but reaction was not carried out (- - -). (1) Chromatography peak of NADA.

III. RESULTADOS

878

L.G. Nisembaum et al. / Neurochemistry International 62 (2013) 873–880

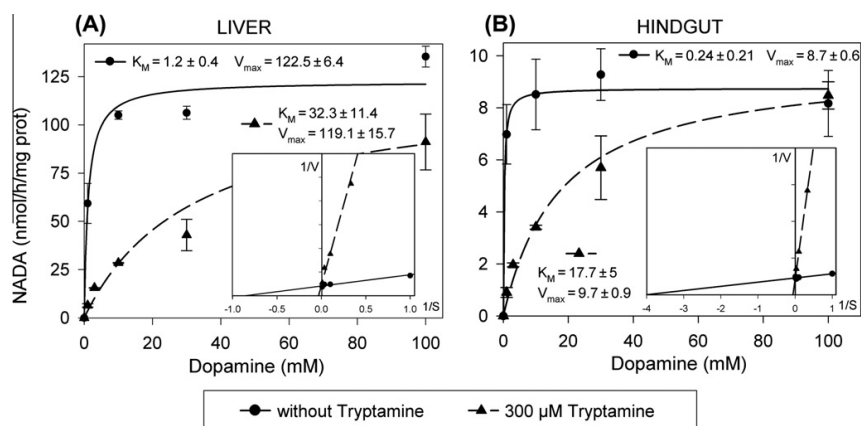


Fig. 5. Kinetic characterization of N-acetyldopamine (NADA) production by goldfish liver (A) and hindgut (B) respect to dopamine, in the absence or presence of tryptamine (300 μ M). Acetyl-coenzyme-A was added at 1 mM. Kinetic constants were calculated by non-linear regression. K_M is expressed as mM, and V_{max} as nmol/h/mg prot. Inset graphs depict the Lineweaver-Burk plot of the data illustrating the competitive nature of tryptamine inhibition.

Table 2
Effect of selective inhibitors on dopamine acetylation in goldfish gut and liver.

Tissue	No inhibitor	Folic acid (1 mM)	CoA-S-N-acetyltryptamine (10 μ M)
Foregut	22.47 \pm 2.92	13.40 \pm 2.22	19.21 \pm 4.20
Hindgut	31.08 \pm 1.53	28.38 \pm 0.56	23.49 \pm 1.11
Liver	85.79 \pm 24.48	76.21 \pm 6.69	ND

Dopamine was added to the assay at 30 mM concentration. Data expressed the N-acetyldopamine production in nmol/h/mg prot (mean \pm SEM, $n = 4$). The N-acetyldopamine production was not detected (ND) in the retina.

levels in gut and liver of zebra finch (Van't Hof and Gwinner, 1999), but it does not modify the gut content of this indoleamine in duck (Lee et al., 1995) and rat (Bubenik and Brown, 1997), suggesting indirectly that in these species melatonin content found in the gut could be synthesized locally. Altogether these reports suggest that only a few species of vertebrates seems to produce intestinal melatonin, meanwhile this possibility is not yet demonstrated in many other species.

Besides melatonin synthesis, present results pointed to alternative roles for the AANAT activity in liver and gut. In teleost two isoforms of AANAT can be identified by their substrates affinities, the AANAT1 acetylates a broad range of substrates including phenylethylamines, while AANAT2 only acetylates indoleamines (Falcón et al., 2009; Zilberman-Peled et al., 2011). In goldfish, expression of both *gAanat-1* and *gAanat-2* is found in the retina, liver, foregut, and hindgut, while the pineal only expressed *gAanat-2* (Velarde et al., 2010a, 2013). Our results demonstrated that tyramine and DA compete with tryptamine as alternative substrates for AANAT activity in the retina, liver and gut, but not in the pineal. This substrate preference of AANAT in the digestive tract and the retina coincides with that expected for AANAT1, and suggest that this would be the predominant active isoform in goldfish liver and gut. In support of this possibility a partial cDNA fragment encoding goldfish AANAT-1 has been recently cloned and identified in liver, foregut and hindgut of this teleost (Velarde et al., 2013).

The AANAT acetylates DA in goldfish liver producing NADA, and this NADA production by liver homogenates is totally abolished in the presence of a potent and selective bisubstrate inhibitor of AANAT (i.e., the CoA-S-N-acetyltryptamine, present results). The specificity of this inhibitor has been previously demonstrated by quantifying N-acetyltryptamine formation in ovine and rat pineal homogenates (Hickman et al., 1999; Coon et al., 2001), and in liver and gut homogenates from goldfish (Velarde et al., 2013). This acetylation of DA by the AANAT is an interesting result and

suggests that this enzyme can be involved in the regulation of DA metabolism in liver. To our knowledge, this suggested role for AANAT in DA metabolism has not been previously described in the gastrointestinal tract of any vertebrate. Nevertheless, previous studies implicated the NADA in the regulation of liver metabolism, as it is involved in the folate metabolism (Anguera and Stover, 2006), and it can be acting as a substrate of phenolsulfotransferase activity in human liver (Khoo et al., 1990; Wong et al., 1991).

Liver DA and NADA could be released via the bile into the foregut, where it could exert some local functions. In mammals, DA regulates digestive process, but no information is available in other vertebrates. DA delays gastric emptying in rats, probably mediated by an impairment of pyloric relaxation via D3 receptors (Kashyap et al., 2009). DA also relaxes the ileum and colon reducing the motility of the distal part of rodent intestine (Kirschstein et al., 2009; Zizzo et al., 2010; Zhang et al., 2012), but induces early contraction in duodenum and jejunum via D1 receptors (Kirschstein et al., 2009). Present data demonstrates for the first time in fish a DA-induced gut contraction, while NADA does not modify gut motility, suggesting that the effect of DA on intestinal transit is a well conserved function throughout phylogeny.

Present results show that, in presence of acetyl-coenzyme-A, DA is acetylated in both, foregut and hindgut. The affinity of AANAT1 (K_M values) for DA in the gut of goldfish, is similar to the previously described for this enzyme in the retina of seabream and zebrafish (Zilberman-Peled et al., 2006). Thereby, the intestinal AANAT1 could acetylate DA in the μ M range. To date there is no report on intracellular DA content in the enteric dopaminergic neurons. Present results show that 1 μ M of DA increases gut motility, suggesting that extracellular DA concentration in goldfish gut is likely in the low μ M range.

Various enzymatic activities can be involved in the regulation of DA content in gut. Our assays with the specific inhibitor of AANAT, the CoA-S-N-acetyltryptamine, suggest that DA acetylation

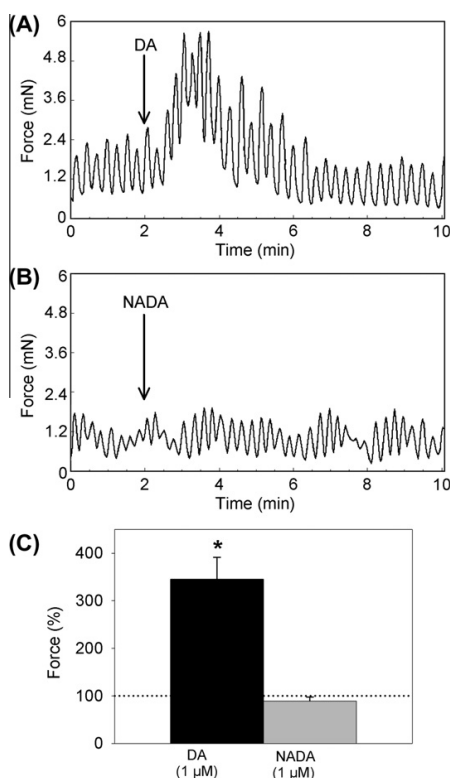


Fig. 6. Effect of dopamine (DA) and N-acetyldopamine (NADA) on foregut motility in goldfish. Representative original traces showing the effect of 1 μ M DA (A) and NADA (B) on gut motility. Arrows indicate the time of the addition of drugs. (C) Normalized maximal contraction force after drug addition. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 5-7$). Dotted line indicates the basal contraction tone (100%) before drug addition. * $p < 0.05$; significant differences between drugs (ANOVA).

appears to be mediated by another N-acetyltransferase. In support of this proposal, the ANAT has been detected in the gut of the hamster (Hein et al., 2006). However, the fact that folic acid, a specific inhibitor of the ANAT activity does not modify DA acetylation in the gut of goldfish, pointed to another folate-insensitive N-acetyltransferase as the responsible enzyme. Indeed, the role played by the AANAT1 in gut remains to be clarified.

5. Conclusions

In this report we show for the first time the functional activity of AANAT throughout a 24-h cycle in foregut, hindgut, liver and retina of goldfish. In addition, retinal HIOMT is also functional, showing a daily rhythmic profile unlike most of the previous studies on this enzyme in other vertebrates. Besides melatonin production, present study suggests an alternative role for AANAT regulating DA and NADA levels in liver. Finally, DA regulates gut motility in goldfish.

Acknowledgments

This study was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN, AGL2010-22247-C03-02) and by the UCM/Santander (GR35/10-A). L. Nisembaum and A.B. Tinoco are predoctoral fellowship from the Spanish MAEC-AECID and MICINN, respectively. The CoA-S-acetyltryptamine was kindly provided by

the National Institute of Mental Health's Chemical Synthesis and Drug Supply Program. No competing interests declared.

References

- Alonso-Gómez, A.L., Gancedo, B., Alonso-Bedate, M., Agapito, M.T., Delgado, M.J., 1992. Characterization of serotonin N-acetyltransferase in the lateral eye of the green frog *Rana perezi*: protective action of EGTA. *J. Neurochem.* 58, 587–592.
- Anguera, M.C., Stover, P.J., 2006. Methylenetetrahydrofolate synthetase is a high-affinity catecholamine-binding protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 455, 175–187.
- Bernard, M., Guerlotti, J., Grève, P., Gréchez-Cassiau, A., Iuvone, M.P., Zatz, M., Chong, N.W., Klein, D.C., Voisin, P., 1999. Melatonin synthesis pathway: circadian regulation of the genes encoding the key enzymes in the chicken pineal gland and retina. *Reprod. Nutr. Dev.* 39, 325–334.
- Besseau, L., Benyassi, A., Möller, M., Coon, S.L., Weller, J.L., Bœuf, G., Klein, D.C., Falcón, J., 2006. Melatonin pathway: breaking the “high-at-night” rule in trout retina. *Exp. Eye Res.* 82, 620–627.
- Bubenik, G.A., 2008. Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. *J. Physiol. Pharmacol.* 59 (Suppl. 2), 33–51.
- Bubenik, G.A., Brown, G.M., 1997. Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of the rat. *Biol. Signals* 6, 40–44.
- Bubenik, G.A., Pang, S.F., 1997. Melatonin levels in the gastrointestinal tissues of fish, amphibians, and a reptile. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 415–419.
- Coon, S.L., Weller, J.L., Korf, H.W., Nambodiri, M.A., Rollag, M., Klein, D.C., 2001. CAMP regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT, EC 2.3.1.87): a new cell line (1E7) provides evidence of intracellular AANAT activation. *J. Biol. Chem.* 276, 24097–24107.
- Duggleby, R.G., 1981. A nonlinear regression program for small computers. *Anal. Biochem.* 110, 9–18.
- Falcón, J., Besseau, L., Fuentès, M., Sauzet, S., Magnanou, E., Bœuf, G., 2009. Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates. *Ann. NY Acad. Sci.* 1163, 101–111.
- Fernández-Durán, B., Ruibal, C., Polakof, S., Ceinos, R.M., Soengas, J.L., Míguez, J.M., 2007. Evidence for arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT2) expression in rainbow trout peripheral tissues with emphasis in the gastrointestinal tract. *Gen. Comp. Endocrinol.* 152, 289–294.
- Gern, W.A., Wechsler, E., Duvall, D., 1984. Characteristics and non-rhythmicity of retinal hydroxyindole-O-methyltransferase activity in trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 53, 169–178.
- Hein, D.W., Doll, M.A., Nerland, D.E., Fretland, A.J., 2006. Tissue distribution of N-acetyltransferase 1 and 2 catalyzing the N-acetylation of 4-aminobiphenyl and O-acetylation of N-hydroxy-4-aminobiphenyl in the congenic rapid and slow acetylator Syrian hamster. *Mol. Carcinog.* 45, 230–238.
- Hickman, A.B., Nambodiri, M.A.A., Klein, D.C., Fred, D., 1999. The structural basis of ordered substrate binding by serotonin N-acetyltransferase. *Cell* 3, 361–369.
- Iigo, M., Hara, M., Ohtani-Kaneko, R., Hirata, K., Tabata, M., Aida, K., 1997. Photocircadian regulations of melatonin rhythms in fishes. *Biol. Signals* 6, 225–232.
- Iuvone, P.M., Chong, N.W., Bernard, M., Brown, A.D., Thomas, K.B., Klein, D.C., 1999. Melatonin biosynthesis in chicken retina. Regulation of tryptophan hydroxylase and arylalkylamine N-acetyltransferase. *Adv. Exp. Med. Biol.* 460, 31–41.
- Kashyap, P., Micci, M.A., Pasricha, S., Pasricha, P.J., 2009. The D2/D3 agonist PD128907(R-)-trans-3,4a, 10b-tetrahydro-4-propyl-2H,5H-[1]benzopyrano-[4,3-b]-1,4-oxazin-9-ol) inhibits stimulated pyloric relaxation and spontaneous gastric emptying. *Dig. Dis. Sci.* 54, 57–62.
- Kezuka, H., Iigo, M., Furukawa, K., Aida, K., Hanyu, I., 1992. Effects of photoperiod, pinealectomy and ophthalmectomy on circulating melatonin rhythms in the goldfish (*Carassius auratus*). *Zool. Sci.* 9, 11047–11053.
- Khoo, B.Y., Sit, K.H., Wong, K.P., 1990. An HPLC-ED procedure for measuring total phenolsulfotransferase (PST) activity in human liver, platelets and blood. *Clin. Chim. Acta* 194, 219–228.
- Kirschstein, T., Dammann, F., Klostermann, J., Rehberg, M., Tokay, T., Schubert, R., Köhling, R., 2009. Dopamine induces contraction in the proximal, but relaxation in the distal rat isolated small intestine. *Neurosci. Lett.* 465, 21–26.
- Klein, D.C., 2007. Arylalkylamine N-acetyltransferase: “the Timezyme”. *J. Biol. Chem.* 282, 4233–4237.
- Kulczykowska, E., Kalamaz, H., Warne, J.M., Balment, R.J., 2006. Day-night specific binding of 2-[125I]iodomelatonin and melatonin content in gill, small intestine and kidney of three fish species. *J. Comp. Physiol. B* 176, 277–285.
- Lee, P.P., Shiu, S.Y., Chow, P.H., Pang, S.F., 1995. Regional and diurnal studies of melatonin and melatonin binding sites in the duck gastro-intestinal tract. *Biol. Signals* 4, 212–224.
- Li, Z.S., Pham, T.D., Tamir, H., Chen, J.J., Gershon, M.D., 2004. Enteric dopaminergic neurons: definition, developmental lineage, and effects of extrinsic denervation. *J. Neurosci.* 24, 1330–1339.
- Li, Z.S., Schmauss, C., Cuenca, A., Ratcliffe, E., Gershon, M.D., 2006. Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. *J. Neurosci.* 26, 2798–2807.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Nisembaum, L.G., Velarde, E., Tinoco, A.B., Azpeleta, C., de Pedro, N., Alonso-Gómez, A.L., Delgado, M.J., Isorna, E., 2012. Light-dark cycle and feeding time differentially entrains the gut molecular clock of the goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol. Int.* 29, 665–673.

III. RESULTADOS

- Nowak, J.Z., Szymańska, B., Zawilska, J.B., Bialek, B., 1993. Hydroxyindole-O-methyltransferase activity in ocular and brain structures of rabbit and hen. *J. Pineal Res.* 15, 35–42.
- Pévet, P., Balemans, M.G.M., Legerstee, C., Vivien-Roels, B., 1980. Circadian rhythmicity of the activity of hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the formation of melatonin and 5-methoxytryptophol in the pineal, retina and harderian gland of the golden hamster. *J. Neural Trans.* 49, 229–245.
- Sánchez-Hidalgo, M., Alarcón de la Lastra, C., Carrascosa-Salmoral, M.P., Naranjo, M.C., Gómez-Corvera, A., Caballero, B., Guerrero, J.M., 2009. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp. Gerontol.* 44, 328–334.
- Stefulj, J., Hörtnner, M., Ghosh, M., Schauenstein, K., Rinner, I., Wölfler, A., Semmler, J., Liebmann, P.M., 2001. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J. Pineal Res.* 30, 243–247.
- Van't Hof, T.J., Gwinner, E., 1999. Influence of pinealectomy on stalk deflection on circadian gastrointestinal tract melatonin rhythms in zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *J. Biol. Rhythms* 14, 185–189.
- Velarde, E., Alonso-Gómez, A., Azpeleta, C., Isorna, E., Delgado, M.J., 2009. Melatonin attenuates the acetylcholine-induced contraction in isolated intestine of a teleost fish. *J. Comp. Physiol. B* 179, 951–959.
- Velarde, E., Cerdá-Reverter, J.M., Alonso-Gómez, A.L., Sánchez, E., Isorna, E., Delgado, M.J., 2010a. Melatonin-synthesizing enzymes in pineal, retina liver, and gut of the goldfish (*Carassius auratus*): mRNA expression pattern and regulation of daily rhythms by lighting conditions. *Chronobiol. Int.* 27, 1178–1201.
- Velarde, E., Delgado, M.J., Alonso-Gómez, A.L., 2010b. Serotonin-induced contraction in isolated intestine from a teleost fish (*Carassius auratus*): characterization and interactions with melatonin. *Neurogastroenterol. Motil.* 22, 364–373.
- Velarde, E., Vivas, Y., Valenciano, A.I., Delgado, M.J., Alonso-Gómez, A.L., 2013. Evidences of melatonin synthesis in the liver and gut of a teleost: in vitro activity and cloning of AANAT-1. *J. Comp. Physiol.* (under revision)
- Ward, A., Hickman, D., Gordon, J.W., Sim, E., 1992. Arylamine N-acetyltransferase in human red blood cells. *Biochem. Pharmacol.* 44, 1099–1104.
- Wilkinson, G.N., 1961. Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem. J.* 80, 324–332.
- Wong, K.P., Khoo, B.Y., Sit, K.H., 1991. Biosynthesis of PAPS in vitro by human liver. Measurement by two independent assay procedures. *Biochem. Pharmacol.* 41, 63–69.
- Zawilska, J.B., Lorenc, A., Berezińska, M., Vivien-Roels, B., Pévet, P., Skene, D.J., 2006. Diurnal and circadian rhythms in melatonin synthesis in the turkey pineal gland and retina. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145, 162–168.
- Zhang, X., Guo, H., Xu, J., Li, Y., Li, L., Zhang, X., Li, X., Fan, R., Zhang, Y., Duan, Z., Zhu, J., 2012. Dopamine receptor D1 mediates the inhibition of dopamine on the distal colonic motility. *Trans. Res.* 159, 407–414.
- Zilberman-Peled, B., Ron, B., Gross, A., Finberg, J.P.M., Gothilf, Y., 2006. A possible new role for fish retinal serotonin-N-acetyltransferase-1 (AANAT1): dopamine metabolism. *Brain Res.* 1073–1074, 220–228.
- Zilberman-Peled, B., Bransburg-Zabary, S., Klein, D.C., Gothilf, Y., 2011. Molecular evolution of multiple arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) in fish. *Mar. Drugs* 9, 906–921.
- Zizzo, M.G., Mulè, F., Mastropaolo, M., Serio, R., 2010. D1 receptors play a major role in the dopamine modulation of mouse ileum contractility. *Pharmacol. Res.* 61, 371–378.

NEUROGASTROENTEROLOGY AND MOTILITY (2014) (Submitted) **DOPAMINE MODULATES GUT MOTILITY IN GOLDFISH (*Carassius auratus*) VIA D₁-LIKE RECEPTORS.**

L. G. Nisembaum, A. Briones, L. A. González, A. L. Alonso-Gómez, M. J. Delgado, A. I. Valenciano.*

Institution address: Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II). Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid, Spain.

ABSTRACT

Background Dopamine regulates digestive processes and intestinal motility in mammals, but studies in non-mammalian vertebrates are scarce. The aim of the present study was to investigate the possible role of dopamine on foregut motility in goldfish, and deepen into the receptors and the intracellular signaling pathways involved. **Methods** We used an *in vitro* organ bath system, coupled to an isometric force transducer for studying dopamine effect on foregut motility. The distribution pattern of dopamine receptor subtypes in different layers of the foregut was studied by PCR. **Key Results** A biphasic effect of dopamine *in vitro* was observed, inducing a contraction at low concentration (1 μM), and relaxations at higher concentrations (10 and 100 μM). To identify the receptor subtypes involved in the dopaminergic relaxation we used specific antagonist for D₁ and D₂ dopaminergic receptors, and antagonist for α- and β-adrenergic receptors. Dopamine-induced relaxation was totally blocked by D₁ receptor antagonist. Moreover, we found that D_{1a1}, D_{1b}, D_{1c}, D_{2a}, and D₃ receptor subtypes are differently distributed in the muscular-serosa and mucosa-submucosa layers. The relaxing effect of DA was not blocked by inhibitors of nitric oxide synthase, adenylyl cyclase and guanylyl cyclase enzymes. Finally, dopamine relaxing effect seems to be exerted directly on muscle cell, since it is insensitive to both, a voltage-dependent Na⁺ channel blocker and to atropine. **Conclusions & Inferences** Dopamine induces relaxation in goldfish foregut, probably acting directly on muscle cells via D₁-like receptors through a cAMP-, cGMP-, oxide nitric- and cholinergic-independent mechanism, and interacting with the serotonergic regulation.

Keywords: dopamine, dopaminergic receptors, goldfish, gut motility.

INTRODUCTION

Dopamine (DA), a neurotransmitter in the nervous system (1,2) is a key regulator of many physiological functions, as pituitary hormones production, cognition, reward system and ocular light adaptation, among others (1,3,4). In vertebrates DA is also involved in the regulation of some gastrointestinal functions mediated by the enteric nervous system (5,6), as gut motility (7,8,9,10). It is reported stimulatory or inhibitory effects of DA on gut motility depending on doses, gut region and species. Thus, DA-induced contraction has been described in the esophagus of chicken (7) and duodenum of rat (11), and recently in goldfish intestinal bulb (10). However, DA-induced relaxation is the most common feature reported in different vertebrates,

being observed in jejunum, ileum and colon of rat (12,13,14), jejunum of guinea pig (15), colon of dog (16), and duodenum, ileum, large intestine and caecum of chicken (7).

DA effects are mediated by specific dopaminergic receptors that in mammals are grouped in two classes, the D₁ class that includes two subtypes (D_{1A} and D_{1B}, also called D₁ and D₅, respectively), and D₂ group that comprises the D₂, D₃ and D₄ subtypes (17). In non-mammalian vertebrates, the D₁ and D₂ classes are also identified, and the expressed subtypes depend on the number of gene duplications that occurred in each group. In jawed vertebrates it had been suggested up to five subtypes for D₁ class (D_{1A}, D_{1B}, D_{1C}, D_{1D}, and D_{1X}) (18,19). Ulterior studies from a higher number of species demonstrated that

III. RESULTADOS

the molecular phylogeny of D₁ class may be simplified into three subtypes, the D_{1A}, D_{1B/X}, and D_{1C/D} (20). Besides, teleost fish possess at least two additional copies of D₁ receptor genes, the D_{1X} receptor gene (21) and the D_{1A1} isoform in goldfish (22) and European eel (23), likely due to the teleost-specific genome duplication (24). The specific genome duplication of the D₂ family in the teleost lineage had generated key differences among fish species. While most fish possess two or three paralogs of D₂ and D₄ receptor genes, only one D₃ receptor gene subtype has been found in all teleost analysed so far (20). In goldfish D₂-like receptors are classified in D_{2A}, D_{2B1}, D_{2B2}, D₃ D₄ subtypes and the short isoform D_{2B1S} (25).

The expression of dopaminergic receptors in different intestinal layers has been only studied in mammals (9). Transcripts of D₁, D₃ and D₅ subtypes are expressed in the nerve-containing layers and also in gut mucosa; D₂ receptors transcripts are restricted to neurons; and the transcript for D₄ is found only in the mucosal layer (9). To date there is no information concerning expression of DA receptors in gut of non-mammalian vertebrates. The involvement of such dopaminergic receptors in gastrointestinal functions has been scarcely investigated.

The relevance of DA on gastrointestinal muscle activity in fish has been shown in *Raja radiata* and *Gadus morhua* (26), and recently in goldfish (10). The present study aimed to deepen into the characterization of the role of DA on motility in goldfish foregut, and to explore the receptors and intracellular mechanisms underlying such action.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Goldfish (*Carassius auratus*) weighting 30-50g were purchased from a local supplier in Madrid (Spain) and maintained for at least two weeks before the assays under acclimation conditions at the laboratory: 12 h of light and 12 h of dark (12L:12D), lights on at 8:00 h, and daily feeding time at 10:00h. The experiments were approved by the Animal

Experimentation Committee of Complutense University, and were carried out in accordance with the European Communities Council Directive (2010/63/UE).

Drugs

The following drugs: acetylcholine (ACh), atropine, dopamine (DA), domperidone, Nw-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), noradrenaline (NA), 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), propranolol, (R(+))SCH23390, 5-hydroxytryptamine hydrochloride (5-HT) and yohimbine, were purchased from Sigma-Aldrich, (Madrid, Spain). Tetrodotoxine (TTX) were purchased from Abcam Biochemicals, (Cambridge, UK) and 2',3', dideoxyadenosine (DDA) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA). The drugs were dissolved and diluted in distilled water, except the atropine and NA that were firstly dissolved with a small amount of hydrochloride acid 0,1N; and domperidone and ODQ which were firstly dissolved in a small amount of dimethyl sulfoxide. The final content of hydrochloride acid 0.1N was 0,08% (for atropine), and 0,003% (for NA); and of dimethyl sulfoxide was 0,5% (for domperidone) and 0,05% (for ODQ). All drugs were prepared fresh before use.

Gut motility quantification

The putative effect of the different drugs tested on goldfish intestinal motility was quantified in an organ bath system as previously described (27). Briefly, fish were sacrificed 1-h post feeding, the whole gut was rapidly removed and cleaned. Foregut strips (1 cm) were mounted longitudinally and attached to an isometric force transducer (LCM Systems Ltd., Cibertec, Madrid, Spain). For each foregut preparation, a first trial with acetylcholine (10 $\mu\text{M l}^{-1}$) was done to determine the tissue maximal contraction, as a control of an adequate response. The following three sets of experimental designs were carried out to deepen into the mechanism of action of DA (100 $\mu\text{M l}^{-1}$) in goldfish foregut.

Effect of DA on foregut motility

Firstly, a non-cumulative concentration-response curve of DA on the foregut motility of goldfish was performed by adding

separately five different concentrations of DA ($0.1\mu\text{M l}^{-1}$, $0.3\mu\text{M l}^{-1}$, $1\mu\text{M l}^{-1}$, $10\mu\text{M l}^{-1}$ and $100\mu\text{M l}^{-1}$). Foregut strips were rinsed twice with fresh saline solution between consecutive concentrations, and the next concentration of DA was added once the steady baseline was reached.

Dopaminergic receptors and DA signaling pathways

In a second set of experiments, to determine the receptor subtype involved in the DA-induced relaxation, two specific antagonists of dopaminergic receptors were tested, the R(+)-SCH23390 for D_1 -like family, and domperidone for D_2 -like family. Both antagonists were added separately at $10\mu\text{M l}^{-1}$, 5 min before the addition of DA ($100\mu\text{M l}^{-1}$) to the medium. To discard a possible cross-binding of DA with adrenergic receptors, foregut strips were pre-incubated with α - and β -adrenergic antagonists (yohimbine and propranolol, respectively) both at $10\mu\text{M l}^{-1}$, 5 min before the addition of DA ($100\mu\text{M l}^{-1}$) to the medium. To confirm the effectiveness of these antagonists in goldfish foregut motility, these same trials were carried out, using NA ($10\mu\text{M l}^{-1}$) instead of DA after the incubation with the antagonists. To investigate the possible signalling pathway that could be mediating the DA relaxing effects, the foregut strips were incubated with specific inhibitors of adenylyl cyclase (DDA, $10\mu\text{M l}^{-1}$), nitric

oxide synthase (L-NAME, $100\mu\text{M l}^{-1}$) and guanylyl cyclase enzymes (ODQ, $1\mu\text{M l}^{-1}$), for 5 min before DA addition ($100\mu\text{M l}^{-1}$) to the medium in three different assays.

Is enteric neurons signalization involved in the effect of DA on foregut motility?

To elucidate if a possible interaction with cholinergic or serotonergic regulation underlies the DA-induced relaxation, the foregut was pre-incubated for 5-10 min with DA ($100\mu\text{M l}^{-1}$) before the addition of Ach or 5HT (both at $10\mu\text{M l}^{-1}$). Moreover, the foregut was pre-incubated with atropine ($100\mu\text{M l}^{-1}$), the general antagonist of muscarinic receptors, before the addition of DA to the medium. To confirm if the enteric neurotransmission is required for the relaxing effect of DA on foregut motility, foregut strips were incubated with the voltage-dependent Na^{2+} channel blocker, tetrodotoxin (TTX, $1\mu\text{M l}^{-1}$) until stabilization (5-10 min) before the addition of DA ($100\mu\text{M l}^{-1}$).

Expression and distribution of dopaminergic receptors in goldfish foregut

Fish were anesthetized in cold water and sacrificed by decapitation. Pituitary gland was extracted as a control tissue for distribution of DA receptors. The foregut was excised and separated into two layers: the muscle with the adherent myenteric plexus (MMP) and the mucosa-submucosal containing the submucosal plexus (MSP). Tissues were stored at -80°C until used. Total RNA was extracted with Trizol (TRI® Reagent method, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and treated with DNase (Promega, Madison, USA) at 37°C for 40 min to eliminate genomic DNA. Then, $0.25\mu\text{g}$ of RNA from the pituitary gland, and $1\mu\text{g}$ of RNA from the intestine were retro-transcribed using the SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA). The tissue distribution of DA receptors subtypes (D_{1A1} , D_{1B} , D_{1C} , D_{2A} , D_{2B1} , D_{2B2} , D_3 , D_4 , D_{2B1S} and D_{2B1L}) was studied by PCR performed in a $25\mu\text{l}$ final volume containing: 1,25 U of Taq DNA Polymerase recombinant, PCR Buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl pH 8,4), 1,5 mM of MgCl_2 (all from Invitrogen, Carlsbad, USA), $1\mu\text{M}$ of primers (Sigma-Aldrich, Madrid,

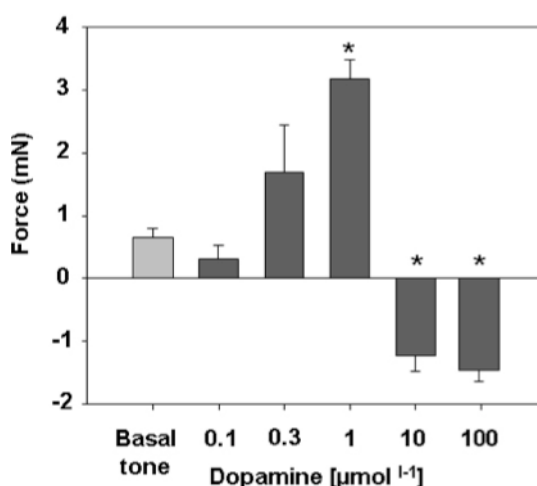


Figure 1. Non-cumulative concentration-response curve of dopamine on foregut motility in goldfish (*Carassius auratus*). Results are expressed as mean \pm s.e.m. ($n = 4-7$). *: statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to the basal tone in absence of dopamine.

III. RESULTADOS

Spain) for D₁-like, D_{2B2}, D₃ and D₄ receptors, or 0.4 μ M of primers for the remaining D₂-like receptors; and 2 and 6 μ l of cDNA, for foregut and pituitary gland, respectively. The PCR protocol was the following: 1 cycle at 94°C for 3 min for the enzyme activation and 40 cycles for denaturation, annealing and extension consisting in 94°C for 45 s, different annealing temperatures during 30 s (see Table 1) and 72°C for 1 min. The β -actin and the elongation factor EF-1- α were used as reference genes (Table 1).

For most of the D₂-like genes, the primers used were the same than the ones used by Popescu and coworkers (2011) for the identification of D₂-like receptors in different tissues of goldfish (Table 1). For D₁-like, D₃ and D₄ genes, the specific primers were designed by hand made using an alignment tool (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) to identify and select divergent parts between their sequences in GeneBank-NCBI. The specificity of the amplification reactions was confirmed by the melting temperature, the size of the obtained PCR products in a 1.5% agarose gel, and also by purifying the extracted bands from the gel (GenElute™ Gel Extraction Kit, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and proceeding their sequencing (Genomic Unity from the

Complutense University, Madrid, Spain).

The confirmation of the correspondent amplified gene sequence was obtained by carrying out a BLAST to compare each sequence with the sequences from the GeneBank-NCBI data base.

Data analysis and statistics

Differences in force (mN) were recorded via an amplifier (Pre205, Cibertec, Madrid, Spain) to a PC, using data acquisition software (ADQ2C, CromaNec, Madrid, Spain). The results are expressed as mean \pm s.e.m. Statistical differences were tested by one-way or two- way ANOVA (depending on the experiment) followed by a SNK test for post-hoc comparisons, with $p < 0.05$ considered as the statistically significant threshold.

RESULTS

Biphasic effect of DA on foregut motility in goldfish

The non-cumulative concentration-response curve in isolated foregut show a biphasic effect of DA, with small contractions at lower concentrations (being significant at $1\mu\text{M l}^{-1}$ compared to the basal tone), and relaxations at higher concentrations (10 and $100\mu\text{M l}^{-1}$) respect to the basal tone (Fig.1). In the following experiments we used $100\mu\text{M l}^{-1}$ DA

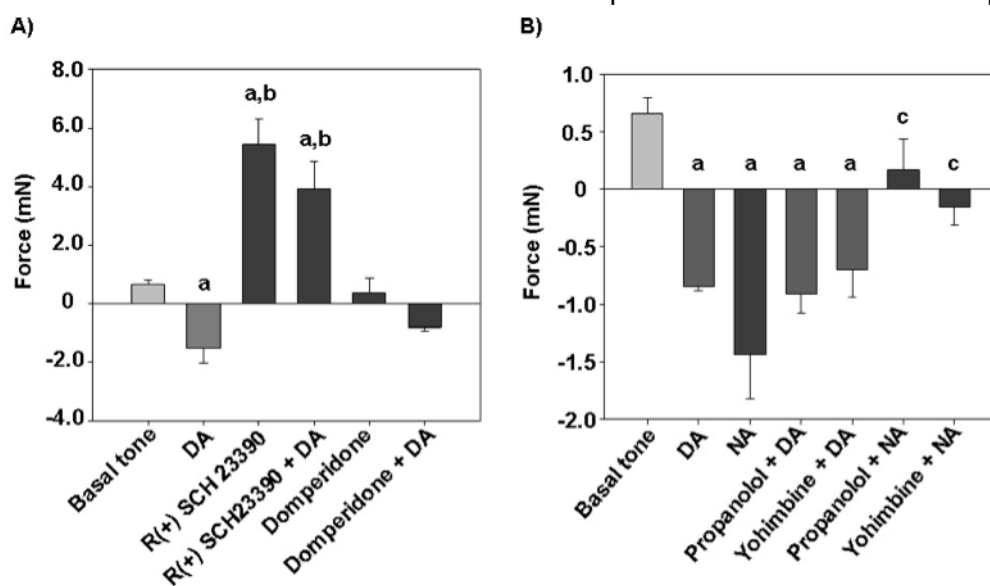


Figure 2. Effects of (A) dopaminergic and (B) adrenergic antagonists on dopamine-induced relaxation in goldfish foregut. Results are expressed as mean \pm s.e.m. ($n = 4-6$). Drugs concentration is $10\mu\text{M l}^{-1}$ and DA concentration is $100\mu\text{M l}^{-1}$ concentration. Superscript letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between experimental groups: *a* compared to the basal tone, *b* compared to DA group, and *c* compared to NA group.

III. RESULTADOS

concentration to explore the DA-induced relaxation in the goldfish foregut.

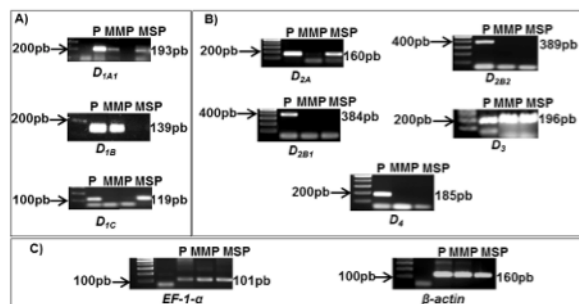


Figure 3. mRNA expression of dopaminergic receptors in two layers of the goldfish foregut, the muscle-myenteric plexus (MMP) and the mucosa-submucosal plexus (MSP) in a 1% agarose electrophoresis gel with ethidium bromide and a 100bp molecular marker. (A) D₁-like receptors, (B) D₂-like receptors and (C) reference genes *EF-1-α* and *β-actin*. Pituitary gland (P) is used as a positive control.

The DA-induced relaxation in goldfish foregut is mediated by D₁-like receptors

The presence of a D₁ antagonist, R(+)-SCH23390 (10μM l⁻¹) in the medium caused an 8-fold increase in the basal tone of foregut (Fig. 2A), and the pre-incubation with this blocker before the addition of DA (100μM l⁻¹) counteracted the DA-induced relaxation (Fig. 2A). By contrast, the pre-incubation with the D₂ antagonist (domperidone, 10μM l⁻¹) did not modify the DA relaxing effect (Fig. 2A). The Figure 2B shows a relaxing effect of NA (10μM l⁻¹) by itself in a similar magnitude than the one induced by DA. Both adrenergic antagonists, yohimbine and propranolol, counteracted as expected the NA-induced foregut relaxation, but did not modify DA-induced relaxation.

D₁ and D₂ dopaminergic receptors are expressed in the foregut

The Figure 3 shows the expression of D₁-like receptors found in the two layers of foregut, the MMP and the MSP. Regarding the D₁-like receptors, we identified the subtype D_{1A1} in both MMP and MSP layers, while the D_{1B} subtype was only observed in the MMP layer, and the D_{1C} in the MSP layer (Fig. 3A).

Concerning the D₂-like receptors, the subtype D_{2A} was only found in MSP layer, while D_{2B1}, D_{2B2} and D₄ were absent in both MSP and MMP layers (Fig. 3B). The

expression of the D₃ subtype was observed in both studied layers (Fig. 3B). Besides, the alternative spliced variants of D₂ receptor (D_{2B1S} and D_{2B1L}) were not observed in the foregut of goldfish (data not shown). The expression of the reference genes is shown in Fig. 3C. The pituitary gland, as control tissue, showed expression of all the studied dopaminergic receptors subtypes (Fig. 3A, B and C). The sequencing of the extracted bands from the agarose gel confirmed the amplification of the adequate sequences for each pair of primers that were used (see Table 1).

Signalling pathways and enteric neurons in the DA effect on foregut motility

None of the inhibitors tested (DDA, L-NAME or ODQ) to deep into the signaling pathway of DA in the goldfish foregut motility were effective as blockers of its relaxing effect (Fig. 4). On the other hand, the pre-incubation for 5 min with DA did not attenuate the cholinergic contraction induced by Ach (10μM l⁻¹) (Fig 5). We also tested the effect of DA after the pre-incubation of foregut with the general antagonist of muscarinic receptors (atropine, 100μM l⁻¹). This cholinergic

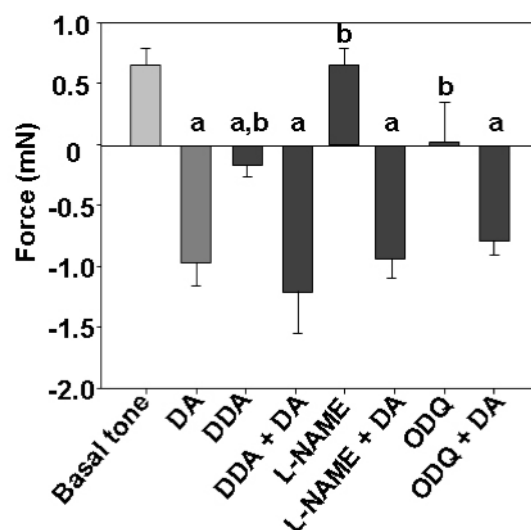


Figure 4. Effects of inhibitors of adenylyl cyclase (DDA), nitric oxide synthase (L-NAME), and guanylyl cyclase (ODQ) on dopamine-induced relaxation in goldfish foregut. Results are expressed as mean \pm s.e.m. (n = 4-7). Superscript letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between experimental groups: a compared the basal tone, b compared to DA group.

III. RESULTADOS

antagonist was unable to block the DA-induced relaxation (Fig 5). In addition, the pre-incubation for 10 min in the presence of TTX did not significantly modify DA relaxing effects on foregut motility. DA-induced relaxation was of -0.86 ± 0.14 mN when DA was added alone to the medium, and -1.22 ± 0.38 mN in the presence of TTX. The addition of 5HT ($10 \mu\text{M l}^{-1}$) to the medium induced a foregut contraction similar to that produced by the cholinergic stimulation, and the pre-incubation with DA for 5 min before 5HT ($10 \mu\text{M l}^{-1}$) addition reduced (3.3 fold) the serotonergic contraction (Fig. 6).

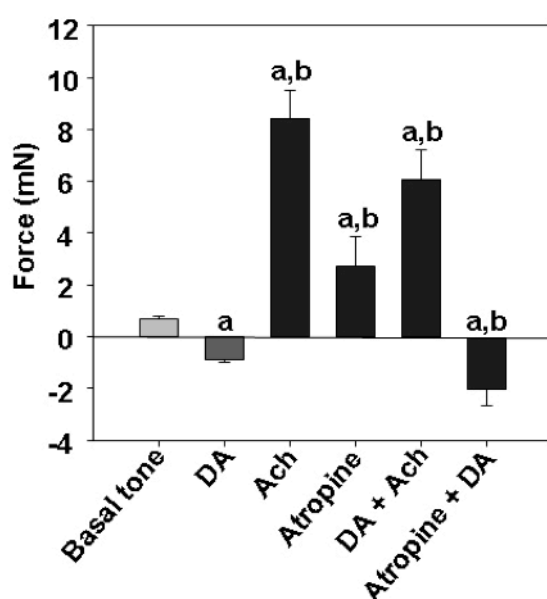


Figure 5. Effect of dopamine on cholinergic contraction and effect of atropine on dopamine-induced relaxation in goldfish foregut. Results are expressed as mean \pm s.e.m. ($n=3-10$). Superscript letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between experimental groups: *a* compared to the basal tone, *b* compared to DA group.

DISCUSSION

Present results bring to knowledge of new functions of DA on gastrointestinal motility regulation in teleosts. A concentration-dependent biphasic effect of DA in the foregut of goldfish is demonstrated, with small contractions at low concentration ($1 \mu\text{M l}^{-1}$) and relaxations at higher concentrations (10 and $100 \mu\text{M l}^{-1}$). This dual effect of DA on gastrointestinal motility has been previously reported in mammals, where contractions or relaxations have been described mostly dependent on the studied region (11). Contractions often

occurs in proximal parts of the gastrointestinal tract (11,7) while the relaxation effect is found in distal regions of different species (16,15,14,11). One interesting feature of the DA biphasic effect in goldfish concerns the time-course response. Thus, DA-induced contraction is a rapid response (less than 1 minute) compared to a slow DA-induced relaxation (with a time delay of 2 minutes before the relaxing effect started). Similar differences in the time-course of the motility response have been also described in the small intestine of rats (11).

Our results clearly show that D_1 -like receptors mediate DA relaxing effect on foregut motility in goldfish, since the relaxation is blocked by a specific D_1 -like receptor antagonist, but not by a specific D_2 -like receptor antagonist. These results agree with previous reports in mouse ileum (28) and colon (29). The involvement of D_2 -like receptors in the DA-induced relaxation is discarded in goldfish foregut, as occurs in rodents intestine (28,29). Some previous reports suggest that unspecific binding to adrenergic receptors can be involved in the DA-induced relaxation observed in jejunum and ileum of rat (11), and in ileum of mouse (28). However, such possible cross binding of DA with adrenergic receptors is clearly discarded in goldfish foregut, since the relaxing effect of DA was not modified by the pre-incubation of foregut with either α -

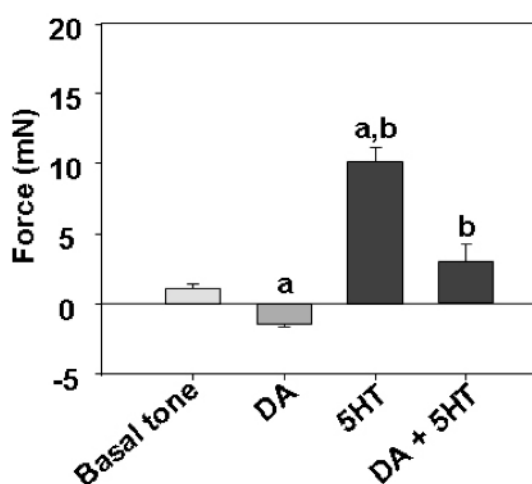


Figure 6. Effects of dopamine on the serotonergic-induced contraction in goldfish foregut. Results are expressed as mean \pm s.e.m. ($n = 4-13$). Superscript letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between experimental groups: *a* compared to the basal tone, *b* compared to DA group.

or β -adrenergic antagonists. The efficacy of yohimbine and propranolol as adrenergic antagonists (at the doses tested) in our organ bath system with goldfish foregut strips is demonstrated by their blocking effect of the relaxation induced by NA. Then, both drugs can be used as useful tools to investigate adrenergic regulation of gut motility in fish.

The expression analysis carried out in the present study show a broad presence of D_1 -like receptors, D_{1A1} , D_{1B} and D_{1C} , in different layers of goldfish foregut. The D_{1A1} subtype was detected in both intestinal layers (MMP and MSP), while the D_{1B} and the D_{1C} subtypes were only detected in one layer each (the MMP and the MSP, respectively). This distribution pattern reinforces that the relaxing effect of DA on intestinal motility in goldfish can be mediated by its binding to D_1 -like specific receptors. Our results on specific locations of such D_1 -like receptors agree with studies in gut of mice demonstrating that D_1 receptors are expressed in both nerve-containing layers and in the mucosa (9). The teleost-specific genome duplication caused that goldfish express three receptor subtypes belonging to dopaminergic D_2 family. Regarding the localization of such D_2 -like receptors in goldfish gut we have found that D_{2B1} and D_{2B2} subtypes were not expressed in any of the intestinal layers studied. This lack of expression of different D_{2B} subtypes receptors in gut of goldfish confirms previous reports that exclude the presence of D_{2B} subtype in the gut of this species (25), as in the European eel (*Anguilla anguilla*) (30). However, we have found expression of D_{2A} subtype in the MSP layer of goldfish, in contrast to a previous report in the gut of grass carp, where the D_{2A} receptor was not detected (31). These differences could be species-specific, or could be justified by differences in the PCR protocol used to detect expression levels. The presence of all the receptors subtypes in the control tissue (pituitary gland) confirms the efficiency of the PCR protocols used for searching dopaminergic receptors in goldfish foregut. It seems that there is only one D_2 receptor subtype in the gut of mice, and its expression is restricted to

enteric neurons in the MMP (9). Both, mammals and goldfish have only one subtype of D_3 receptor that shows a similar expression pattern in both MMP and MSP layers (9, present results). The D_4 receptors are expressed in the MSP layer in mice (9), but we were unable to find them in the goldfish gut. All together these results suggest that D_4 , D_{2B} and, likely D_{2A} subtypes are not involved in the foregut motility in goldfish. The expression of D_3 found in the MMP indicates that this receptor subtype is a good candidate to mediate the actions of DA on intestinal motility in fish. Nevertheless, the fact that the relaxing effect of DA was not modified by the pre-incubation of foregut with a D_2 general antagonist raises the question of the involvement of D_3 receptor subtype in such relaxing effect. Alternatively, our results open up a possibility of the involvement of D_3 subtype in the DA contractile effect in goldfish foregut.

Regarding the mediators underlying the dopaminergic actions on foregut motility in goldfish, many reports point to the nitric oxide as a good candidate to be involved in gut relaxation. On one hand, a dense nitrergic innervation throughout the digestive tract has been reported (32). On the other, the vasoactive intestinal peptide (VIP) and its homologue, the pituitary adenylate cyclase activating-peptide (PACAP) are important relaxing agents of gut smooth muscle in teleost, and cells containing VIP/PACAP commonly also contains the nitric oxide synthase (33). Besides, VIP/PACAP stimulates nitric oxide synthesis in smooth muscle cells, and the nitric oxide from both nerve and muscle cells can activate the downstream of cGMP (34,35). Finally, cGMP target the contractile signaling pathways being able to induce a relaxation (34). In fact, a nitrergic inhibitory tone of gut motility was observed in some teleosts as the Atlantic cod (36), zebrafish (*Danio rerio*) (37), and goldfish (38). In spite of all the above mentioned, the pre-incubation of foregut strips with either the inhibitor of nitric oxide synthase or the inhibitor of the guanylyl cyclase did not counteract DA-induced relaxation in goldfish, discarding that the nitric oxide is

III. RESULTADOS

involved in the dopaminergic relaxing effects. In agreement with present results, L-NAME did not cause any change in DA-induced relaxation in mouse ileum, suggesting that nitric oxide is not involved in such relaxation (28). In fact, nitric oxide does not mediate the effects of other relaxing agent as melatonin, since L-NAME did not block the effect of this indoleamine on cholinergic contraction in goldfish (38). On the other hand, the specific inhibitor of adenylyl cyclase (DDA) reduced the relaxation caused by DA in the mice ileum (28), suggesting the involvement of the cAMP pathway on DA-induced relaxation in this rodent. However, our results obtained with DDA do not support such possibility in goldfish.

It is shown that gut spontaneous contraction strongly depends on the Ach and/or 5HT release, and the inhibition of Ach release (e.g. by the noradrenergic system) causes a smooth muscle relaxation (39,40). However, we cannot support this mechanism regarding DA-induced relaxation in goldfish foregut, since our results show that DA does not affect Ach-induced contractions, and atropine does not affect DA-induced relaxation. Therefore, the relaxation of goldfish foregut caused by DA should occur through a non-cholinergic pathway.

In addition, spontaneous contraction of smooth muscle in fish was also demonstrated to be nerve-dependent, being reduced by TTX (40). In the present study DA-induced relaxation was insensitive to TTX, as previously reported in mouse ileum (28) and in colon of rats (29), suggesting that the relaxing effect of DA is not mediated by interneurons in goldfish foregut. Thus, altogether these results support that in fish, as in mammals, DA induces relaxation through D₁-like receptor located directly in foregut smooth muscle.

Finally, present results show that DA partially counteracted the foregut contraction induced by 5-HT. Previous studies from our laboratory have shown that the contractile effect of serotonin in goldfish foregut is mediated in part by a cholinergic stimulation, since the pretreatment with atropine blocked serotonin-induced

contraction, but an amplification of the basal myogenic rhythm is still observed (27). In addition, it is also demonstrated an unaltered 5-HT-induced contraction in TTX pretreated intestinal strips in trout (41), reinforcing the direct action of 5-HT on smooth muscle to cause a contraction. Considering all the above, the partially counteraction of 5HT contraction caused by DA pretreatment in present report could be justified by a direct action of both neurotransmitters on the smooth muscle cells of foregut.

In summary, we conclude that DA regulates foregut relaxation in goldfish probably acting directly on muscle cells via D₁-like receptors through a cAMP-, cGMP- and oxide nitric-independent mechanism. Moreover, our data strongly support that DA relaxing effect is independent of the cholinergic control of foregut motility but it likely interacts with the serotonergic regulation directly on muscle cells.

ACKNOWLEDGMENTS, FUNDING, AND DISCLOSURES

This work has been supported by funds from the Spanish MINECO, AGL2010-22247-C03-02. L. Nisembaum is PhD fellowship from Spanish Government (MAEC-AECID). No competing interests declared

Authorship:

L. G. Nisembaum, A. B. Contreras, L. A. G. Blázquez & A.I Valenciano performed the research; and L. G. Nisembaum, A.L. Alonso-Gómez, M.J. Delgado & A.I. Valenciano designed the research study analyzed the data and wrote the manuscript.

REFERENCES

- 1 Strausfeld NJ, Hirth F. Deep homology of arthropod central complex and vertebrate basal ganglia. *Science* 2013; **340**: 157-61.
- 2 Ribeiro P, Gupta V, El-Sakkary N. Biogenic amines and the control of neuromuscular signalling in schistosomes *Invert Neurosci* 2012; **12**: 13-28.
- 3 Dufour S, Sebert ME, Weltzien FA, Rousseau K, Pasqualini C. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. *J Fish Biol* 2010; **76**: 129-60.

- 4 Witkovsky P. Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol*; **108**: 17-40.
- 5 Li ZS, Pham TD, Tamir H, Chen JJ, Gershon MD. Enteric dopaminergic neurons: definition, developmental lineage, and effects of extrinsic denervation. *J Neurosci* 2004; **24**: 1330-9.
- 6 Natale G, Kastsiushenka O, Fulceri F, Ruggieri S, Paparelli A, Fornai F. MPTP-induced parkinsonism extends to a subclass of TH-positive neurons in the gut. *Brain Res* 2010; **1355**: 195-206.
- 7 Lot TY. Effects of dopamine on the gastrointestinal tract of chicks. *J Pharm Pharmacol* 1993; **45**: 892-95.
- 8 Anlauf M, Schäfer MK-H, Eiden L, Weihe E. Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J Comp Neurol* 2003; **459**: 90-111.
- 9 Li ZS, Schmauss C, Cuenca A, Ratcliffe E, Gershon MD. Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D₂ receptor: Analysis of dopamine receptor expression, location, development and function in wild-type and knock-out mice. *J Neurosci* 2006; **26**: 2798-807.
- 10 Nisembaum LG, Tinoco AB, Moure AL, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ, Valenciano AI. The arylalkylamine-N-acetyltransferase (AANAT) acetylates dopamine in the digestive tract of goldfish: A role in intestinal motility. *Neurochem Int* 2013; **62**: 873-80.
- 11 Kirschstein T, Dammann F, Klostermann J, Rehberg M, Tokay T, Schubert R, Köhling R. Dopamine induces contraction in the proximal, but relaxation in the distal rat isolated small intestine. *Neurosci Lett* 2009; **465**: 21-26.
- 12 Lucchelli A, Boselli C, Chiari MC, Grana E. Analysis of the relaxing effect of dopamine on the isolated rat jejunum. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1986; **279**: 234-47.
- 13 Boselli C, Lucchelli A, Grana E. Receptors involved in the dopamine-induced relaxation of the isolated rat ileum. *Pharmacol Res Comm* 1987; **19**: 953-56.
- 14 Aguilar MJ, Estañ L, Martínez-Mir I, Martínez-Abad M, Rubio E, Morales-Oliva FJ. Effects of dopamine in isolated rat colon strips. *Can J Physiol Pharm* 2005; **83**: 447-52.
- 15 Lucchelli A, Boselli C, Grana E. Dopamine-induced relaxation of the guinea-pig isolated jejunum is not mediated through dopamine receptors. *Pharmacol Res* 1990; **22**: 433-44.
- 16 Grivegnée AR, Fontaine J, Reuse J. Effect of dopamine on dog distal colon in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 1984; **36**: 454-57.
- 17 Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK. Molecular diversity of dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993; **32**: 281-307.
- 18 Callier S, Snapyan M, Le crom S, Prou D, Vincent JD, Vernier P. Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Bio Cell* 2003; **95**: 489-502.
- 19 Le Crom S, Kapsimali M, Barôme PO, Vernier P. Dopamine receptors for every species: gene duplications and functional diversification in Craniates. *J Struct Funct Genomics* 2003; **3**: 161-76.
- 20 Yamamoto K, Vernier P. The evolution of dopamine systems in chordates. *Front Neuroanat* 2011; **5**: 1-21.
- 21 Yamamoto K, Mirabeau O, Bureau C, et al. Evolution of dopamine receptor genes of the D₁ class in vertebrates. *Mol Biol Evol* 2013; **30**: 833-43.
- 22 Frail DE, Manelli AM, Witte DG, Lin CW, Steffey ME, Mackenzie RG. Cloning and characterization of a truncated dopamine D1 receptor from goldfish retina: stimulation of cyclic AMP production and calcium mobilization. *Mol Pharmacol* 1993; **44**: 1113-8.
- 23 Cardinaud B, Sugamori KS, Coudouel S, Vincent J-D, Niznik HB, Vernier P. Early emergence of three dopamine D1 receptor subtypes in vertebrates. Molecular phylogenetic, pharmacological, and functional criteria defining D_{1A}, D_{1B}, and D_{1C} receptors in European eel *Anguilla anguilla*. *J Biol Chem* 1997; **272**: 2778-87.
- 24 Volff JN. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* 2005; **94**: 280-294.
- 25 Popesku JT, Navarro-Martín L, Trudeau VL. Evidence for alternative splicing of a dopamine D₂ receptor in a teleost. *Physiol Biochem Zool* 2011; **84**: 135-46.
- 26 Groisman SD, Shparkovskii IA. The effect of dopamine and dopa on the

III. RESULTADOS

electrical activity of stomach muscles in the skate *Raja radiata* and cod *Gadus morhua*. *J Evol Biochem Phys* 1989; **25**: 505-11.

27 Velarde E, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ. Serotonin-induced contraction in isolated intestine from a teleost fish (*Carassius auratus*): characterization and interactions with melatonin. *Neurogastroenterol Motil* 2010; **22**: 364-73

28. Zizzo MG, Mulè F, Mastropaulo M, Serio R. D1 receptors play a major role in the dopamine modulation of mouse ileum contractility. *Pharmacol Res* 2010; **61**: 371-78.

29 Zhang X, Guo H, Xu J, et al. Dopamine receptor D1 mediated the inhibition of dopamine on the distal colonic motility. *Transl Res* 2012; **159**: 407-14.

30 Pasqualini C, Weltzien FA, Vidal B, et al. Two distinct dopamine D2 receptor genes in the European Eel: Molecular characterization, tissue specific transcription, and regulation by sex steroids. *Endocrinology* 2009; **150**: 1377-92.

31 Wang X, Zhao T, Wei H, Zhou H. Regulation of dopamine D2 receptor expression in grass carp pituitary cells: A possible mechanism for dopaminergic modification of luteinizing hormone synthesis. *Gen Comp Endocrinol* 2011; **173**: 48-55.

32 Brüning G, Hattwig K, Mayer B. Nitric oxide synthase in the peripheral nervous system of the goldfish, *Carassius auratus*. *Cell Tissue Res* 1996; **284**: 87-98.

33 Olsson C, Karila P. Coexistence of NADPH-diaphorase and vasoactive intestinal polypeptide in the enteric nervous system of the Atlantic cod (*Gadus morhua*) and the spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Cell Tiss Res* 1995; **280**: 297-305.

34 Watkins CC, Boehning D, Kaplin AI, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Carbon monoxide mediates vasoactive intestinal polypeptide-associated nonadrenergicnoncholinergic neurotransmission. *P Natl Acad Sci USA* 2004; **101**:2631-35.

35 Murthy KS. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu Rev Physiol* 2006. **68**: 345-74.

36 Karila P, Holmgren S. Enteric reflexes and nitric oxide in the fish intestine. *J Exp Biol* 1995; **198**: 2405-11.

37 Holmberg A, Olsson C, Holmgren S. The effects of endogenous and exogenous nitric oxide on gut motility in zebrafish *Danio rerio* embryos and larvae. *J Exp Biol* 2006; **209**: 2472-79.

38 Velarde E, Alonso-Gómez AL, Azpeleta C, Isorna E, De Pedro N, Delgado MJ. Melatonin effects on gut motility are independent of the relaxation mediated by the nitrergic system in the goldfish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2011; **159**:367-71.

39 Scheibner J, Trendelenburg AU, Hein L, Starke K, Blandizzi C. α_2 -Adrenoceptors in the enteric nervous system: a study in α_{2A} -adrenoceptor-deficient mice. *Brit J Pharmacol* 2002; **135**: 697-704.

40. Olsson C, Holmgren S. Autonomic control of gut motility: A comparative view. *Auton Neurosci-Basic* 2011; **165**: 80-101.

41 Burka JF, Blair RM, Hogan JE. Characterization of the muscarinic and serotonergic receptors of the intestine of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Physiol Pharmacol* 1989; **67**: 477-82.

Table 1. Sequence of primers used for reverse transcription-PCR.

Target gene	Accession number		Primer sequences 5' → 3'	Product (pb)	Annealing temperature (°C)
<i>D_{1A1}</i>	LO8602	Forward	ACGACAGCATGGGCAGC	193	60
		Reverse	CTGATGCAGGGGAGACCGTT		
<i>D_{1B}</i>	EF37732 7.1	Forward	TCTACCGGTTTCGCGCATGTC	139	63
		Reverse	TTCAGGACTTTGGTCTCGCG		
<i>D_{1C}</i>	EF39623 3.1	Forward	AGCGGGCAACGGCACCGATT	119	60
		Reverse	TGTACGTGGCGATCATGATAAT		
<i>D_{2A}</i>	FJ793516 .1	Forward	TGTCACCCATGACGATGCTC	160	59.8
		Reverse	GCGTTTGGTGTGACACGTT		
<i>D_{2B1}</i>	FJ793517 .1	Forward	ATTCGCTATTTCTGCCCTTTGTTG	384	61.1
		Reverse	GTAACGTCCACCCTCACATCA		
<i>D_{2B2}</i>	FJ793519 .1	Forward	TTCACATTTTCTGCCCCCTGCTTT	389	62
		Reverse	CCTGCCACGATGTCCACTCCAA		
<i>D_{2B1S}</i>	FJ793517 .1	Forward	CTAAGCCCCCTCTCAAGCA	206	55.8
		Reverse	TGCCCATTTTTTATCATCTCCA		
<i>D_{2B1L}</i>	FJ793517 .1	Forward	TGTCATTCTACGTGCCCTTC	201	58.4
		Reverse	AACCCCCGTTGGTCTTAATG		
<i>D₃</i>	FJ793520 .1	Forward	TTGGCTCTTCAGTCGCTTGT	196	63
		Reverse	AAAAGCAAGGACCCAAACTGTT		
<i>D₄</i>	EF64098 8.1	Forward	GATGTTCTGGGATCAACAACGTCC	185	62
		Reverse	TCCTCAGTTTGGCCTTCCTCG		
<i>EF-1-α</i>	AB05610 4.1	Forward	CCCTGGCCACAGAGATTTCA	101	59.8
		Reverse	CAGCCTCGAACTACCAACA		
<i>β-actin</i>	AB03972 6	Forward	CAGGGAGTGATGGTTGGCA	160	61.1
		Reverse	AACACGCAGCTCGTTGTAGA		

IV. DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos puesto de manifiesto la existencia de osciladores en el TGI del carpín que pueden ser sincronizados tanto por el fotoperiodo como por la hora de alimentación, y modulados por reguladores de la ingesta. En conjunto los resultados apuntan a que el TGI puede ser un elemento importante para el funcionamiento del sistema circadiano en este teleósteo integrando diversas señales para dar respuestas rítmicas de salida. El carpín, ha sido muy utilizado en el campo de la cronobiología desde hace décadas, debido a la gran robustez y plasticidad de su sistema circadiano, pero hasta hace poco tiempo sólo se habían estudiado los ritmos de salida, principalmente los ritmos diarios de actividad locomotora. En el carpín, la actividad locomotora se sincroniza rápidamente a las diversas condiciones ambientales de fotoperiodo y horario de alimentación en el laboratorio (Aranda et al., 2001, Feliciano et al., 2011; Iigo y Tabata, 1996, Sánchez-Vázquez et al., 1997), lo que permite estudiar de modo sencillo la salida de los dos principales sistemas de osciladores, el LEO y el FEO. El abordaje del estudio de la organización del sistema circadiano, encargado de mantener una "homeostasis temporal" en el organismo (Albrecht, 2012), pudiendo estudiar el funcionamiento molecular de los osciladores endógenos en el carpín, no se produjo hasta 2009, cuando se clonaron los primeros genes reloj en esta especie (Velarde et al., 2009). Desde entonces, se han clonado más genes reloj en el carpín (*gClock1a* y *gBmal1a*, (Velarde et al., 2011b); y *gClock2-like*, (Hoskins y Volkoff, 2012) y se ha demostrado que pueden ser sincronizados por un horario fijo de alimentación en el hígado de esta especie (Feliciano et al., 2011). Pero además el carpín es también una de las principales especies modelo en peces para abordar estudios de regulación de la ingesta en estos vertebrados (De Pedro y BT., 2001, De Pedro et al., 2008, Matsuda et al., 2012b, Vivas et al., 2011, Volkoff, 2013). Por tanto, *a priori* el carpín, parecía la mejor especie modelo para abordar los objetivos que nos propusimos en este trabajo, el estudio de la posible interacción entre el sistema circadiano y diversas neurohormonas relacionadas con la ingesta. Los resultados obtenidos en presente Tesis Doctoral así lo confirman, y refuerzan al carpín como especie modelo en cronobiología, demostrándose especialmente útil en el estudio de las interacciones del sistema circadiano con reguladores de la ingesta.

A continuación con la presente Discusión General, se pretenden destacar las principales ideas sobre el funcionamiento de los osciladores circadianos del TGI del carpín y su papel en el sistema circadiano, que se desprenden de la visión general de los resultados obtenidos en los diferentes capítulos que constituyen esta Tesis Doctoral. Así

IV. DISCUSIÓN

mismo se discuten cuestiones aún no resueltas, que podrían ser considerados en estudios futuros acerca del funcionamiento del sistema circadiano en teleósteos y su interacción con la regulación de la ingesta y el balance energético.

1. EL SISTEMA CIRCADIANO EN EL CARPÍN ESTÁ FORMADO POR UNA RED DE OSCILADORES ENDÓGENOS SINCRONIZADOS A DISTINTAS SEÑALES.

Como se ha comentado en la introducción, estudios recientes en mamíferos que muestran alteraciones del equilibrio energético producidas por alteraciones del sistema circadiano (Froy, 2010, Kalsbeek et al., 2011) han marcado un punto de inflexión en la forma de entender el funcionamiento del mismo. Si bien el NSQ es quien de modo principal integra la información lumínica y la envía al resto de osciladores del organismo (Buijs y Kalsbeek, 2001, Reppert y Weaver, 2002), no es el único reloj que integra información ambiental (Albrecht, 2012). En la actualidad, se considera formado por una red de osciladores sincronizados por factores externos (fotoperiodo y alimentación, principalmente) e internos (señales neurales, endocrinas y neuroendocrinas) que, en último término, han de coordinarse para predecir los cambios diarios cíclicos del ambiente, anticipándose a ellos con finalidad adaptativa (Albrecht, 2012; Buijs y Kalsbeek, 2001).

Pese al avance en la última década en el clonaje de genes reloj en diversas especies de peces (Cavallari et al., 2011; Davie et al., 2009; Idda et al., 2012; Martin-Robles et al., 2011; López-Patino et al., 2011b; Sanchez et al., 2010; Velarde et al., 2009b; Vera et al., 2013), primer paso para estudiar el funcionamiento de los osciladores moleculares, apenas se sabe nada de cómo se organiza el sistema circadiano en el organismo y cómo se integran las repuestas. Desde hace años se considera que el sistema circadiano en peces está menos jerarquizado que el de mamíferos (Madrid, 2001; Pando et al., 2001), aunque no se conoce cómo se organizan y comunican los posible osciladores centrales y periféricos, ni si existe una interacción del sistema circadiano con el metabolismo energético y la regulación de la ingesta. Los resultados obtenidos en el capítulo 1 de la Presente Tesis Doctoral demuestran que en el carpín existe una red de osciladores, tanto centrales como periféricos que se sincronizan a diversas señales. Por un lado estos osciladores se sincronizan a señales externas tal como se ha mostrado en el capítulo 1 de este trabajo (y se discutirá en los apartados 1.1. y 1.2 de esta discusión). Por otro lado, estos osciladores probablemente son diana de señales endógenas. En mamíferos las principales serían los glucocorticoides (Sujino et al., 2012, Yamamoto et al., 2005), la glucosa (Lamia et al., 2009), y posiblemente,

hormonas reguladoras de la ingesta, como la orexina y la ghrelina (Akiyama et al., 2004; Feillet 2009; LeSauter et al., 2009), éstas dos últimas objeto de estudio en la presente Tesis también en el capítulo 1 (ver apartado 1.3 de la Discusión).

1.1. El intestino del carpín se sincroniza al fotoperiodo y a la hora de alimentación.

La existencia de la expresión rítmica de algunos genes reloj en el intestino ha demostrado recientemente (Velarde et al., 2009b), aunque no se sabe si se sincronizan al fotoperiodo o a la hora de alimentación. Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han demostrado que los genes reloj estudiados (*gPer1a*, *gPer2a*, *gPer3* y *gCry3*) se sincronizan tanto al fotoperiodo (en ausencia de un horario fijo de alimentación), como a un horario fijo de alimentación (en ausencia de fotoperiodo, en luz constante). Sugiriendo que el LEO y el FEO, clásicamente considerados osciladores independientes, son probablemente los mismos osciladores, que son capaces de sincronizarse con más o menos sensibilidad al ciclo luz-oscuridad o al ciclo ingesta-ayuno, así el FEO y el LEO han de entenderse como funciones y no tanto como osciladores concretos.

Los resultados obtenidos además refuerzan la hipótesis de que el horario de alimentación representa un potente *zeitgeber* en el intestino posterior, tal como ocurre en el hígado de esta misma especie (Feliciano et al., 2011), y en el hígado de mamíferos (Damiola et al., 2000, Kornmann et al., 2007, Saini et al., 2013, Stokkan et al., 2001).

1.1.1. Regulación por el fotoperiodo y la hora de alimentación de *Per1a* y *Cry3*.

Como se discute en el capítulo 1 los resultados obtenidos indican que *Per1* y *Cry3* en general tienen una expresión paralela y anticipan los factores sincronizadores de fotoperiodo y hora de alimentación. Bajo los fotoperiodos 12L:12D y 12D:12L, los picos de expresión de los genes *gPer1a* y *gCry3* (además de *gPer2a* que se discutirá más adelante), anticiparon el momento del encendido de las luces. La capacidad de anticipar a la llegada de la luz presentada por el gen *Per1* es una característica común, (tanto en tejidos periféricos como centrales) en la mayoría de los peces estudiados (Lopez-Olmeda et al., 2010, Pando et al., 2001; Huang et al., 2010, Park et al., 2007, López Patiño et al., 2011; Velarde et al., 2009b). Además, *gPer1a* en el carpín puede anticipar no solamente el momento de encendido de las luces sino también la llegada de alimento, cuando este aparece de manera cíclica en el tiempo. De hecho las acrofases de los ritmos de *Per1* son próximas al horario de alimentación en los tres ciprínidos en que se ha realizado este tipo de estudio (el pez cebra y el cavernícola, Cavallari et al., 2011; y el carpín Feliciano et al.,

IV. DISCUSIÓN

2011; y el presente trabajo). Estos datos sugieren que *Per1* es un gen clave controlado por el reloj independientemente de cómo se sincronice.

En el pez cebra, los ritmos de *Per1* sincronizados a la horas de alimentación observados en oscuridad disminuyeron o fueron inexistentes bajo luz constante (López-Olmeda et al., 2010, Vatine et al., 2011), probablemente debido a un efecto de enmascaramiento producido por la luz. Este efecto no estaría afectando al intestino posterior del carpín en el presente estudio, dado que este tejido probablemente no sea fotosensible (como se discutirá posteriormente en el apartado 1.2. de la Discusión). Esto refuerza el empleo del carpín como especie modelo para estudiar organización del sistema circadiano y la influencia de diversas señales en la expresión de genes reloj.

En mamíferos se ha sugerido que los genes de la familia *Cry* forman parte del FEO dado su participación en la FAA (Iijima et al., 2005) y en la transducción de señales de nutrientes a los relojes circadianos periféricos (Lamia et al., 2009). En teleósteos aún existe poca información en cuanto a la regulación del gen *Cry3*. En el pez cebra, se han observados variaciones día/noche en su expresión principalmente en el ojo y cerebro, y bajo condiciones de oscuridad constante se observa una oscilación circadiana en el ojo, con niveles más altos durante el final de la noche subjetiva coincidiendo con el pico de *Per1* (Kobayashi et al., 2000). En el carpín se han observado ritmos de expresión de *gCry3* en la retina, intestino e hígado, bajo 12L:12D y horario fijo de alimentación (Velarde et al., 2009b) cuyas acrofases se dieron también durante la fase oscura. En condiciones de luz constante y alimentación fijada, se ha observado la expresión rítmica de *gCry3* en el hígado, sincronizados al horario de alimentación y en paralelo al perfil de *Per1a* (Feliciano et al., 2011). Estos datos, junto con los obtenidos en la presente sugieren que *gCry3* pueda ser un gen controlado por el reloj, debido a su perfil de expresión similar al perfil diario de expresión de *gPer1a* en las distintas condiciones de aclimatación.

1.1.2. Regulación por el fotoperiodo y la hora de alimentación de *Per3*.

Los ritmos diarios del *gPer3* no fueron sincronizados por el ciclo luz/oscuridad en el intestino del carpín. Tal como se ha discutido en primer artículo del capítulo 1 (apartado 1.2) las acrofases de este gen en los fotoperiodos invertidos, sugieren se dependen de la última hora en que comió, incluso en presencia de un fotoperiodo. Aunque probablemente existe una interacción entre los dos *zeitgebers* para la regulación de la expresión de este gen, ya que se ha observado una reducción de la amplitud de los ritmos de *gPer3* cuando los animales se aclimataron bajo luz u oscuridad constante. Posteriormente en esta Tesis

doctoral (capítulo 1, apartados 1.3 y 1.4) se muestra que la expresión de *Per3* modulada por la administración de orexina y ghrelina, siendo el gen que se induce siempre significativamente tras la administración de estas hormonas en los distintos tejidos estudiados. Aunque aún no se ha demostrado si efectivamente *Per3* estaría indicando la hora de llegada de la comida en el intestino del carpín, los datos obtenidos en el conjunto del capítulo 1, junto con algunos otros descritos indican que este gen puede ser especialmente importante en osciladores con relacionados con la regulación de la ingesta en peces. Así, la expresión de *gPer3* observada en los osciladores periféricos es aproximadamente 10 veces mayor que la de la retina del carpín (Velarde et al., 2009b) mientras que en el pez cebra el ritmo de *gPer3* baja más lentamente en osciladores periféricos en comparación al ritmo observado en la retina (Kaneko et al., 2006). Esta fuerte dependencia de *gPer3* a la hora de la alimentación podría estar relacionada a la alta sensibilidad de los osciladores periféricos a las señales de alimentación descrita en peces (Feliciano et al., 2011; López-Olmeda et al., 2010; Velarde et al., 2009b, 2010).

1.1.3. Señales "no diarias" que pueden producir sincronización de los genes reloj.

Los resultados del presente trabajo también sugieren la importancia de factores no rítmicos como mediadores de la sincronización relacionada al alimento en el intestino posterior. Un ejemplo es la expresión de *gPer1a* que se mantiene rítmica en luz constante y con una amplitud similar a cuando el fotoperiodo está presente incluso con horario de alimentación aleatorio (capítulo 1, apartado 1.2). De modo similar, en animales bajo las mismas condiciones también se ha observado ritmos de expresión de *gPer1a* en el hígado (Feliciano et al., 2011) y de *gAanat2* en la pineal, en el hígado y en el intestino posterior del carpín (Velarde et al., 2010a).

La sincronización de un reloj por señales sin ritmicidad diaria ha sido descrita en mamíferos (Escobar et al., 2007, Mendoza et al., 2008a, Tahara et al., 2011). Cómo se originan ritmos diarios en la expresión de genes reloj si las señales no llegan con un ritmo diario de 24 h se desconoce. La explicación podría estar en la diferente sensibilidad a las señales externas dependiendo del estatus metabólico del animal y del periodo de ayuno previo a la llegada de la señal de alimentación (Escobar et al., 2007; Hirao et al., 2010, Mendoza et al., 2008b, Silver et al., 2011). En este sentido, hormonas como la ghrelina y la orexina, que informan de un estado de ayuno podrían estar implicadas en modificar la sensibilidad de algunos osciladores. Los resultados obtenidos en el capítulo 1 (capítulo 1,

IV. DISCUSIÓN

apartados 1.3 y 1.4) apoyarían esta hipótesis, ya que son capaces de modular la expresión de genes reloj (ver apartado 1.3 de la Discusión).

Nuestros resultados también han demostrado que un cambio de 12h en el suministro de la última alimentación, fue capaz de eliminar el ritmo de expresión de genes reloj en el intestino posterior en peces que estaban previamente sincronizados a un horario fijo de alimentación. Este dato demuestra la alta sensibilidad del intestino posterior a señales de alimentación y pone en cuestión el pensamiento clásico de que la sincronización al alimento es “circadiana”, tal como se ha cuestionado también de modo reciente previamente en mamíferos (Escobar et al., 2007; Silver et al., 2011). El estudio de nuevos genes reloj en el carpín, de las salidas directas que están regulando los osciladores hepático e intestinal, así como el conocimiento de cómo se comunican los distintos relojes para dar una respuesta integrada, serán necesarios para poder explicar este punto.

El hecho de que los genes reloj estudiados, presentaran una sincronización al horario de alimentación, demuestra que el oscilador intestinal puede estar dirigido por la hora de la comida, y por tanto también las funciones gástricas rítmicas que dependen de él. Se ha mostrado la expresión rítmica de los genes *gAanat2* y *gHiomt2* (Velarde et al., 2010a), así como más recientemente de *gAanat1* (datos del grupo no publicados), todos ellos genes que codifican para las dos últimas enzimas de la biosíntesis de melatonina, demostrando por tanto que el intestino posee la maquinaria no sólo para ser un oscilador (resultados del presente trabajo) sino también generar respuestas rítmicas de salida. El intestino además presenta un ciclo constante de renovación de células epiteliales que puede ser regulado por genes reloj (Peyric et al., 2013), además de ejercer un papel en la regulación de la ingesta, enviando señales de apetito y de saciedad a núcleos centrales, a través de la secreción y liberación hormonal, como también a través de la transmisión de señales mecánicas de todo el TGI vía inervación vagal aferente, como la distensión o vaciamiento gastrointestinal (Cummings y Overduin, 2007, Naslund y Hellstrom, 2007). Todas estas características, junto con la sincronización de genes reloj en el intestino por factores de fotoperiodo y alimentación demostrada en esta Tesis Doctoral, refuerzan la importancia del intestino como un oscilador capaz de integrar distintas señales ambientales y fisiológicas, así como también capaz de generar señales rítmicas y de influenciar a osciladores en otros tejidos periféricos y centrales.

1.2. La regulación de la expresión de *Per2a* indica, que a diferencia del pez cebra en el carpín no todas las células son fotosensibles.

IV. DISCUSIÓN

Estudios llevados a cabo en el pez cebra han mostrado que todas sus células son directamente fotosensibles, siendo capaces de sincronizarse *in vivo* e *in vitro* a un ciclo de luz-oscuridad (Tamai et al., 2004; Vatine et al., 2011; Whitmore et al., 2000). A la hora de entender la organización del sistema circadiano en el organismo, y la comunicación entre osciladores, es muy importante saber si la luz sincroniza directamente cada oscilador, o si por el contrario son señales internas las que mantienen la sincronización entre los distintos osciladores. Sin embargo esta característica de tener tejidos fotosensibles distribuidos por todo el cuerpo no ha sido demostrada en ninguna otra especie.

En el pez cebra también se conoce bien que la luz activa de modo directo la expresión del gen *Per2* (Pando et al., 2001, Vatine et al., 2009, 2011). De hecho este es el modo por el cual el ciclo luz oscuridad sincroniza el oscilador en esta especie, cuando la luz llega induce *Per2* (Vatine et al., 2009, 2011). En el pez cebra el promotor de *Per2* tiene módulo sensible a la luz (*light responsive module*, LRM) que contiene elementos conocidos como caja-D (mediadores del control transcripcional inducido por la luz) y caja-E (responsables del control del reloj circadiano, Vatine et al., 2009). Se ha demostrado que este gen es principalmente inducido por la luz, y secundariamente es regulado por el reloj molecular (Vatine et al., 2009). Por tanto en el pez cebra, la luz estimula de modo directo la expresión de *Per2a* ya que todos los tejidos son fotosensibles.

Los datos existentes sobre la regulación del gen *gPer2a* en dos especies de peces distintos al pez cebra, sugieren es tejido-dependiente, puesto que anticipa la llegada de la luz como la retina o el cerebro, pero no en los osciladores periféricos. En el carpín la expresión de *gPer2a* aumenta tras el encendido de la luz en la retina (Velarde et al., 2009) y en el hipotálamo (Azpeleta, 2013), con acrofases cercanas a la mitad de la fotofase. Sin embargo, esta expresión rítmica se pierde en el cerebro y en la retina bajo condiciones de luz constante (Feliciano et al., 2011) y en el intestino (resultados del capítulo 1). En la dorada (*Sparus aurata*) las acrofases de *Per2* ocurren siempre en las primeras horas tras el encendido de la luz (ZT2-4) en el cerebro, pero no en el hígado donde también influye la hora de la alimentación (Vera et al., 2013).

Teniendo en cuenta que el promotor de *Per2* está bastante conservado desde mamíferos a peces, incluso en un pez cavernícola ciego (Cavallari et al., 2011; Vatine et al., 2011), en conjunto los datos, permiten proponer que a diferencia del pez cebra los tejidos periféricos del carpín y la dorada no son directamente fotosensibles. Por tanto hay que

IV. DISCUSIÓN

tomar con cautela los resultados sobre el funcionamiento del sistema circadiano del pez cebra a la hora de extrapolarlos a otras especies.

1.3. Interacción de las hormona orexigénicas (orexina y ghrelina) con el sistema circadiano del carpín.

Tal como hemos descrito a lo largo de la presente Memoria, el sistema circadiano del carpín estaría formado por una red de osciladores. Podemos considerar que cada oscilador actuaría como un "mini-sistema-circadiano" con sus propias entradas, integraciones (en forma de expresión de genes reloj) y salidas, de modo que las salidas de unos osciladores podrían actuar como entradas de otros, y por ello estas señales pueden considerarse "sincronizadores endógenos".

Por otro lado teniendo en cuenta la existencia de una importante interacción bidireccional entre el sistema circadiano y los reguladores de la ingesta en mamíferos (Akiyama et al., 2004; Feillet, 2010, LeSauter et al., 2009), y considerando la alta sensibilidad de los tejidos del TGI del carpín a señales relacionadas a la alimentación, hemos abordado en el apartado 1.3. y 1.4. de Resultados de la presente Memoria, una posible interacción de la orexina y la ghrelina, con la expresión de genes reloj y con el ritmo diario de actividad locomotora, para comprender si estas dos moléculas podrían actuar como entradas o "inputs" de osciladores que fuese diana de estas hormonas, formando por tanto parte del FEO.

1.3.1. Interacciones con la expresión de genes reloj

En peces se sabe que la orexina tiene un efecto orexigenico (Nakamachi et al., 2006; MacDonald y Volkoff, 2010; Abbott y Volkoff, 2011, Wall y Volkoff, 2013), interactuando además con otras hormonas reguladoras de la ingesta (Abbott y Volkoff, 2011, Kojima et al., 2009, Miura et al., 2007 Volkoff y Peter, 2001, Volkoff et al., 2003, Yan et al., 2011). Sobre la actividad locomotora tiene efectos menos claros, pudiendo ser estimulante (Prober et al., 2006; Nakamachi et al., 2006) o sedativo (Yokogawa et al., 2007). Se ha sugerido también la importancia de la orexina en la consolidación del comportamiento de sueño/vigilia en peces (Prober et al., 2006; Yokogawa et al., 2007; Appelbaum et al, 2009).

Estudios recientes han descrito una expresión rítmica de orexina hipotalámica en peces sometidos a protocolos de horario fijo de alimentación (Hoskins y Volkoff, 2012, Yan et al., 2011), lo que indica por tanto que la orexina podría ser una salida del oscilador hipotalámico. Además, en la presente Memoria, se ha demostrado por primera vez un efecto de la orexina inyectada ICV, estimulando la expresión de genes reloj pertenecientes

al bucle negativo (*Per*), en un tejido central (hipotálamo) y en un tejido periférico (el intestino anterior), sugiriendo que esta hormona puede actuar también como una señal de entrada (input) del sistema circadiano del carpín, indicando el momento previo a la llegada periódica de alimento (capítulo 1, apartado 1.3). Este doble papel, como salida del hipotálamo, y como entrada en otros osciladores (hipotálamo e intestino anterior), hace de la orexina es una buena candidata a ser una señal sincronizadora endógena en el carpín.

Al igual que la orexina, la ghrelina es otra hormona orexigénica candidata a interaccionar con el sistema circadiano. En la mayoría de los vertebrados la ghrelina se sintetiza principalmente en el estómago (Kojima et al., 1999; Sakata y Sakai, 2010) y en el intestino como es el caso del carpín (Unniapan et al., 2002). Algunos estudios en mamíferos demuestran un perfil rítmico de esta hormona (LeSauter et al. 2009) y sugieren una interacción de la misma con el sistema circadiano (Yannielli et al., 2007; LeSauter et al., 2009, Lamont et al., 2013). Se ha descrito un aumento de la secreción de la ghrelina en anticipación a un horario fijo de alimentación (Cummings et al. 2001, LeSauter et al., 2009), así como también se ha observado una reducción de la FAA en ratones deficientes de receptor de ghrelina (LeSauter et al., 2009, Blum et al., 2009). También, se ha descrito la co-localización de la ghrelina con las proteínas PER1 y PER2 de los respectivos genes reloj en células oxínticas del estómago de ratas, además de un ritmo de expresión de los respectivos genes (LeSauter et al., 2009).

En este trabajo hemos demostrado que la administración intraperitoneal de ghrelina, induce la expresión de los genes *Per* en el hipotálamo y en el hígado del carpín 1 h tras la inyección (capítulo 1, apartado 1.3.). Aunque se desconoce si la ghrelina en el carpín se sintetiza de modo rítmico, el hecho de que expresión depende de las condiciones de ingesta-ayuno (Amole y Unniappan, 2009; Unniappan et al., 2004), hace pensar que podría ser así, tal como se ha descrito en mamíferos (LeSauter et al. 2009). Por tanto al igual que la orexina, la ghrelina podría actuar como un señal sincronizadora endógena, en este caso desde la periferia hacia otras regiones tanto de la periferia como del sistema nervioso central, donde se han descrito receptores para esta hormona (Kaiya et al., 2010).

De los resultados obtenidos también se desprende el hecho de que el [D-Lys³]-GHRP-6 no es un buen antagonista, ya que puede actuar como agonista (capítulo 1, apartado 1.3.). Confirmando recientes resultados obtenidos en un estudio reciente en pollo (*Gallus gallus*; Sirotkin et al., 2013). Este fármaco actúa de modo diferente dependiendo del tejido

IV. DISCUSIÓN

incluso de la acción fisiológica, probablemente debido a la implicación de distintos receptores de ghrelina (Kaiya et al., 2013a).

El gen del bucle positivo, *Bmal1a*, no se modificó ni con la administración de orexina ni de ghrelina, que parecen inducir sólo genes reloj de la familia PER (ver apartado 1.4. de la discusión). Por tanto parece que ambas hormonas actúan sobre las mismas dianas, aunque por el momento se desconoce si de forma independiente o no (tal como se discute posteriormente apartado 1.3.2.).

Aunque no hemos estudiado si la administración de orexina y/o ghrelina sincroniza ritmos diarios de expresión de genes reloj, el hecho de que induzcan de forma rápida la expresión de algunos genes hace pensar que podría ser así. Tal como se ha explicado, el ciclo luz oscuridad sincroniza los osciladores endógenos en el pez cebra induciendo la expresión de *Per2* (Vatine et al., 2009, 2011). El mecanismo para otras hormonas candidatas a ser "señales sincronizadoras endógenas" es semejante. Las más estudiadas son los glucocorticoides, que en mamíferos sincronizan osciladores periféricos (Dickmeis et al., 2013, Pezuk et al., 2012) probablemente mediante la inducción de *Per1* (Balsalobre et al., 2000, Yamamoto et al., 2005). Por tanto, es posible que la inducción de los genes *Per* observada en este trabajo en el carpín, produzca un cambios de fase en el oscilador si la inducción se mantiene un tiempo suficiente. Este interesante tema está aún sin resolver, y a día de hoy no sabemos el alcance fisiológico que puede tener la modificación aguda de la expresión de genes reloj.

Los dos experimentos realizados para el estudio de la administración de orexina o ghrelina sobre a expresión de genes reloj, se han llevado a cabo en animales saciados (puesto que se pretendía ver el efecto de dos péptidos orexigénicos). Teniendo en cuenta que se han descrito cambios en la sensibilidad a hormonas relacionadas con la ingesta dependiendo del estado de ayuno-saciedad de los animales (incluyendo la ghrelina, (Zhang et al., 2008; Kaiya et al., 2010), así como de la hora del día (Vivas et al., 2011), sería interesante estudiar si los efectos observados dependen de la hora de administración de los fármacos.

Por otro lado esta hora de administración coincide con los mínimos valores de expresión de los genes *Per1a* y *Per3*, en todos los tejidos, y *Per2a* al menos en los tejidos periféricos, tal como mostramos en el capítulo 1 (apartado 1.2.) y se ha descrito en otros trabajos (Azpeleta, 2013; Velarde et al., 2009a). Por tanto los efectos podrían ser también distintos dependiendo de la fase del oscilador molecular.

1.3.2. Comunicación entre regiones centrales y periféricas (interacciones orexina-ghrelina)

Los resultados de la presente Tesis Doctoral apoyan la existencia de una comunicación cerebro-intestino (capítulo 1 apartado 1.3.) así como interacciones entre distintos reguladores de la ingesta, tal como se ha descrito previamente en mamíferos y peces (Kojima et al., 2009; Miura et al., 2007; Toshinai et al., 2003; Volkoff and Peter, 2001).

En el presente estudio, el NPY, uno de los péptidos orexigenicos más potentes descritos en el carpín (Lopez-Patino et al., 1999), tiene aumentada su expresión en el hipotálamo tras la inyección ICV de orexina, como se ha descrito previamente en este teleosteo (Volkoff and Peter, 2001; Kojima et al., 2009) y en el bacalao de estuario (Yan et al., 2011). En concordancia también se ha observado, un amplio número de axones de neuronas productoras de orexina en contacto sináptico directo con células secretoras de NPY en el hipotálamo de roedores y primates (Horvath et al., 1999). Hasta ahora no se han descrito efectos del NPY sobre los genes reloj, pero sin duda, como importante regulador de la ingesta, sería muy interesante abordar este tema en el carpín.

Sin embargo la expresión de NPY no se alteró tras la inyección IP de ghrelina, coincidiendo con resultados descritos en estudios previos en el carpín. La ghrelina inyectada IP no tiene efecto sobre la expresión NPY en el cerebro de este teleosteo, sin embargo, cuando es administrada ICV, la ghrelina es capaz de inducir la expresión de NPY, 2 h tras la inyección (Miura et al., 2006). Además, la inyección de un antagonista de un receptor de NPY (BIBP-3226), también es capaz de bloquear el aumento de la ingesta causado por la ghrelina (Miura et al., 2006). Se ha sugerido entonces que el efecto de la ghrelina inyectada IP, estaría mediado por la vía del NPY, pero no a través de la inducción de su síntesis.

También hemos demostrado que la inyección aguda de orexina ha estimulado en 10 veces la expresión de ghrelina en el intestino anterior del carpín (capítulo 1, apartado 1.3), demostrando por primera vez en vertebrados la existencia no sólo de una interacción intestino-cerebro, sino también cerebro-intestino, en cuanto a regulación de la síntesis de ghrelina. Hasta ahora la interacción que se había descrito era un aumento de la ghrelina diencefálica como respuesta a una inyección ICV de orexina (Miura et al., 2007). A su vez la ghrelina aumentó la expresión hipotalámica de orexina (capítulo 1, apartado 1.4) tal como se había descrito previamente (Miura et al., 2007). En carpín se ha descrito una interacción entre estos dos péptidos para regular la ingesta, puesto que un antagonista de receptores

IV. DISCUSIÓN

de orexina reduce la inducción de la ingesta causada por la ghrelina y viceversa (Miura et al., 2007).

La existencia de esta comunicación entre regiones centrales y periféricas, o entre la orexina y la ghrelina para regular la ingesta, podría también ocurrir en los efectos sobre la expresión de genes reloj mostrados en la presente Tesis. En el capítulo 1 se muestra que tanto la orexina como la ghrelina inducen la expresión de *gPer1a*, *gPer2a* y *gPer3* en hipotálamo y en intestino anterior (orexina) o hígado (ghrelina) coincidiendo con las áreas diana para estas hormonas (Kaiya et al., 2010, Matsuda et al., 2012a). Por tanto queda por elucidar si, los efectos de los dos péptidos son independientes uno o de otro, así como qué ocurriría si ambas señales se reciben a la vez. en los diseños del presente trabajo, se han estudiado tiempos cortos, que aunque hayan sido suficientes para inducir cambios de expresión (la orexina induce la expresión de ghrelina en 1 h, mientras que la ghrelina induce la expresión de orexina en 3 h), probablemente no son suficientes para inducir cambios en las proteínas, por lo que los efectos observados en estos diseños probablemente se deban exclusivamente a cada hormona por separado.

1.3.3. Interacciones con los ritmos diarios de actividad locomotora y el establecimiento de la FAA.

Considerando el perfil de FAA observado en el carpín (Sánchez-Vázquez et al., 1996; Feliciano et al., 2011), que coincide con el aumento de la expresión de orexina previo al horario fijo de alimentación (Hoskins y Volkoff, 2012), hemos buscado provocar un efecto de anticipación similar al de la FAA a través de inyecciones (ICV) diarias de orexina a un horario fijo, durante un periodo de días consecutivos.

Los pocos estudios existentes en los cuales se administra orexina de manera crónica fueron realizados en ratas, a través de infusiones de 7-8 días de duración, y han demostrado un aumento de la ingesta y en el estado de alerta en el periodo diurno (Haynes et al., 1999; (Yamanaka et al., 1999). En roedores las neuronas productoras de orexinas son esenciales para el estado de alerta de la FAA (Mieda et al., 2004), y para la robustez de esta actividad (Akiyama et al., 2004). De hecho, se ha sugerido que el aumento del apetito y el comportamiento de alimentación inducido por la orexina pueda ser una consecuencia de la aumentada actividad locomotora, y que el papel inicial de esta hormona sería el de iniciar y mantener el estado de alerta que precede la alimentación (Bonnavion y de Lecea, 2010).

Los resultados de la presente Tesis Doctoral demuestran por primera vez, el efecto de la orexina exógena sobre la sincronización de la actividad locomotora diaria del carpín,

en ausencia de otro sincronizadores (capítulo 1, apartado 1.3), sugiriendo que la orexina podría estar involucrada en la sincronización de los ritmos de actividad locomotora en el carpín.

En el presente estudio, también se pretendió analizar un posible efecto sincronizador de la ghrelina sobre la actividad locomotora diaria. La mayoría de estudios que analizan el efecto de la ghrelina (o de péptidos análogos) sobre la actividad locomotora, son realizados con administraciones agudas de esta hormona, (Matsuda et al., 2006a; Yannielli et al., 2007, Kang et al., 2011, Yahashi et al., 2012), existiendo pocos estudios sobre su efecto crónico. En peces un estudio crónico ha sido realizado en la trucha marrón, utilizando implantes de ghrelina (Tinoco et al., 2013). Aunque los resultados sean variados dependiendo de la especie, del tipo de ghrelina utilizada y de la vía de administración, se ha observado que la ghrelina puede inducir un aumento de la actividad locomotora en el carpín (Matsuda et al., 2006a). En mamíferos el análogo de ghrelina, GHRP-6, inyectado de forma aguda induce un adelanto de fase de la actividad locomotora diaria en ratones (Yannielli et al., 2007). Apoyando el efecto de la ghrelina sobre la actividad locomotora diaria, también se ha demostrado, que esta hormona puede actuar directamente sobre el núcleo supraquiasmático en ratones, causando un avance de fase de la actividad eléctrica y de la expresión de PER2 (Yannielli et al., 2007).

En este trabajo hemos mostrado que la ghrelina [gGRL[1-19] inyectada durante 7 días consecutivos) no induce respuestas en cuanto a la actividad diferentes a los animales tratados con salino (capítulo 1, apartado 1.4). Sin embargo, en el siguiente diseño experimental, la presencia del antagonista impidió la aparición de la FAA, sugiriendo una participación de la ghrelina en la inducción de la FAA, tal como se ha sugerido en mamíferos. De todos modos, la ghrelina no es probablemente el único factor que regular esta actividad anticipatoria. Se ha demostrado que roedores deficientes (*knock-out*) para el gen del receptor de ghrelina, presentan una FAA atenuada pero no eliminada completamente (LeSauter et al., 2009. Blum et al., 2009), así como una reducción de la activación de neuronas productoras de orexina durante la FAA (Lamont et al., 2012). En el carpín, el efecto de la orexina también es reducido en presencia del antagonista [D-Lys³]-GHRP-6 (Miura et al., 2007). Por lo tanto, estos datos en conjunto apoyan la importancia de la interacción entre hormonas orexigenicas para el establecimiento de la FAA.

1.4. Los genes *per* parecen ser dianas comunes de distintas señales sincronizadoras.

IV. DISCUSIÓN

Los resultados de los diferentes estudios abordados en el capítulo 1, muestran que de entre los diferentes genes reloj estudiados en el carpín, los genes *Per* tienen en general más sensibilidad a ser regulados por las señales externas que *Bmal1* (son los genes de la familia *Per* los que se inducen con orexina y ghrelina).

Curiosamente los genes *Per* en mamíferos son también inducidos por varias señales (Balsalobre et al., 2000, Oike et al., 2011). En peces, como se ha comentado el apartado 1.3.1 de la discusión, la luz induce el gen *Per2* (Azpeleta, 2012, Vera et al., 2013; Vatine et al., 2009, 2011; Velarde et al., 2009b). Por otro lado, concretamente en carpín, los glucocorticoides inducen *Per1* en carpín (Sánchez-Bretaña, resultados del grupo sin publicar), y tal como se ha discutido la orexina y la ghrelina inducen varios genes *Per* (capítulo 1, apartados 1.3 y 1.4). Además llama la atención, la variación existente entre los valores de amplitud de *gPer1a* y *gBmal1a*. En varios tejidos del carpín (hipotálamo, hipófisis y tejido interrenal) la amplitud de *gPer1a* es aproximadamente diez veces superior a la de *gBmal1a* (Azpeleta, 2013). Esto también ocurre en otras especies estudiadas, tanto en peces (López-Patiño et al., 2011) como en mamíferos (Peirson et al., 2006).

En conjunto, los resultados expuestos sugieren que los genes *Per*, además de estar regulados por el reloj) son probablemente diana de otras señales que puedan provenir del exterior, y por tanto una forma por la cual el reloj puede ser reseteado o reajustado. El mecanismo de activación de *per1* que más se ha estudiado es a través de la unión del heterodímero CLOCK: BMAL1 a la caja E-box del promotor de *per1* (Ko y Takahashi, 2006; Vatine et al., 2011). Además, existen una serie de señales extracelulares que pueden influir sobre los osciladores endógenos, actuando sobre los elementos de respuesta a calcio y AMP cíclico (CRE) y elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), que están presentes en el promotor de *per1* (Yamamoto et al., 2005, Ota et al., 2012). Esto explicaría la mayor sensibilidad de los genes *Per* pues son diana de muchas señales.

Por todo lo comentado en esta primera parte de la discusión, los resultados de la presente Tesis Doctoral (capítulo 1) podrían representar una primera evidencia en peces del papel de la orexina y la ghrelina en el funcionamiento del FEO, ya que se demuestra una interacción de la orexina y de la ghrelina con la expresión de genes reloj, además de su participación en la formación/inducción de la FAA. Además los resultados sugieren una interacción entre diferentes hormonas orexigenicas, orexina y ghrelina, con el sistema circadiano en el carpín. Estos datos también refuerzan la idea aceptada actualmente de que

el FEO no tenga una localización concreta, sino esté compuesto de una red de sistemas paralelos, habiendo una interacción entre señales periféricas y centrales (Davidson et al., 2006, Escobar et al., 2009), siendo las señales humorales importantes para el mecanismo de coordinación temporal en regiones sincronizadas por el alimento (Carneiro y Araujo, 2009, 2012). Pensando por tanto en el sistema circadiano del carpín de modo conjunto, además de las hormonas estudiadas en este trabajo, otras señales humorales, metabólicas y/o de disponibilidad de alimento, podrían representar algunos de los componentes sincronizadores del FEO en esta especie.

2. ENZIMAS DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE LA MELATONINA EN EL TGI

2.1. Actividades AANAT y HIOMT en el TGI del carpín y funciones alternativas para la AANAT.

La presencia de MEL en el TGI de varias clases de vertebrados ha llevado a proponer su síntesis local (Bubenik y Brown, 1997, Bubenik et al., 1999, Bubenik y Pang, 1997). En el tracto gastrointestinal de los peces se ha detectado MEL por radioinmunoensayo en algunas especies, como el esturión (*Acipenser fulvescens*), la trucha arco-iris y la carpa común (*Cyprinus Carpio*) (Bubenik y Pang, 1997), y por cromatografía líquida de alta resolución en la trucha arco-iris (Muñoz et al., 2009). Además de la presencia de MEL, otra prueba indirecta a favor de su síntesis gastrointestinal se ha encontrado en el carpín (Kezuka et al., 1992) y la lubina (Bayarri et al., 2003), donde se detectan niveles diurnos de MEL circulante en peces pinealectomizados y con enucleación ocular bilateral. Sin embargo, el carácter altamente lipófilo de esta indolamina, que garantiza un libre movimiento entre compartimentos en el organismo, cuestiona que la simple presencia de la hormona en un tejido justifique su síntesis local, pudiendo proceder de otras fuentes, como en el caso del TGI, que el origen puede ser luminal, del alimento (Hardeland y Pandi-Perumal, 2005), de la propia flora intestinal (Hardeland y Poeggeler, 2003), de la bilis (Messner et al., 2001, Munoz et al., 2009), e incluso tener un origen central, y ser captada localmente de la circulación sanguínea.

A fin de contribuir a clarificar de forma directa esta cuestión interesante (y aún no resuelta) de la producción local de MEL en el TGI, nos planteamos que no es suficiente con identificar la presencia de las enzimas clave en su síntesis (AANAT y la HIOMT), sino que es necesario demostrar la funcionalidad de las mismas, en términos de producción de MEL en dichos tejidos. Particularmente, la última enzima de la ruta biosintética, la HIOMT, se

IV. DISCUSIÓN

identificó por primera vez en 1976 en el intestino de conejo (Quay y Ma, 1976), no habiéndose realizado estudios posteriores. Aunque la AANAT ha sido más estudiada y su ARNm se ha encontrado en el TGI de la trucha arcoiris (Fernández-Durán et al., 2007), el carpín (Velarde et al., 2010), la rana común (*Rana perezi*) (Isorna et al., 2006), la codorniz japonesa (*Coturnix coturnix*) (Fu et al., 2001), el hámster siberiano (Gauer et al., 1999) y en la rata (Stefulj et al., 2001), no existen estudios funcionales de ninguna de las dos enzimas en el TGI de estas especies.

En el carpín se ha detectado la expresión de ARNm de la AANAT y de la HIOMT en los principales tejidos productores de MEL, como la pineal y la retina, pero también en el intestino y en el hígado (Velarde et al., 2010a). Tanto en la retina como en el TGI se ha encontrado expresión de dos enzimas pertenecientes a dos familias de AANATs, la *gAanat1* y la *gAanat2*, sin embargo en la pineal sólo parece expresarse la *gAanat2* (Velarde et al., 2010a). La existencia de estas dos familias de AANAT en teleósteos en general se justifica en base a la duplicación genómica que tuvo lugar próxima al linaje de los teleósteos. Una distribución tisular diferencial de las dos isoformas de la AANAT 1 y 2 en los peces ya había sido descrita previamente, así como sus diferentes cinéticas y afinidades por los sustratos. Así, parece general en todos los peces que la AANAT1 (más parecida a la enzima de los mamíferos) se exprese casi exclusivamente en la retina, muestre mayor afinidad por diferentes indolaminas y arilalkilaminas, mientras que la AANAT2 se expresa principalmente en la pineal, no muestra inhibición por sustratos o productos, y sólo acetila indoletilaminas, particularmente la serotonina, estando por tanto especializada en la producción de MEL (Coon et al., 1999, Zilberman-Peled et al., 2011).

En estudios recientes realizados por nuestro equipo de investigación se han clonado las *gAanat-2* y *gHiomt-2* del carpín, e identificado sus secuencias en tejidos periféricos como el hígado y el intestino posterior, además de en tejidos clásicamente aceptados como productores principales de MEL, como la pineal y la retina (Velarde et al., 2010a). La expresión diaria de la *gAanat-2* se ha descrito en distintas condiciones de alimentación (horario fijo frente a alimentación aleatoria) y de ciclo luz/oscuridad (12L:12D, 12D:12L, 24D y 24L). Como era esperable, la *gAanat-2* de la pineal y la retina se expresa rítmicamente en la mayoría de las condiciones, a excepción de la oscuridad constante en el caso de la pineal, y del fotoperiodo invertido en el caso de la retina. Así mismo se ha encontrado ritmos de expresión de *gAanat-2* en el hígado y en el intestino posterior en estas condiciones ambientales. Todos estos resultados han llevado a proponer que en los

tejidos periféricos del carpín la expresión de *gAanat2* está controlada por un reloj circadiano, y que podría estar implicada en la regulación de la síntesis local de melatonina, a falta de confirmar su funcionalidad y la de la HIOMT en estos tejidos.

En la presente Memoria, se presentan los primeros resultados publicados de cuantificación de la actividad diaria de la enzima AANAT en el intestino anterior y posterior, y en el hígado del carpín. La actividad AANAT *in vitro* presenta oscilaciones rítmicas en la retina y en el intestino anterior, con acrofases próximas a ZT 19 y ZT 16, respectivamente. En el hígado, aunque no se haya observado un ritmo diario significativo, esta enzima muestra una amplitud importante en su variación diaria, superior a la hallada en los restantes tejidos investigados. En la retina la acrofase nocturna del ritmo diario de la AANAT coincide con el ritmo diario de MEL ocular previamente descrito en este teleosteo (Iigo et al., 1997), y en la mayoría de los vertebrados estudiados hasta el momento actual (Iuvone et al., 1999, Besseau et al., 2006, Zilberman-Peled et al., 2006), reforzando el papel limitante clave de esta enzima en la ruta biosintética de MEL ocular.

En la actual Memoria, se ha utilizado la retina del carpín como tejido control para poner a punto el método de cuantificación de la actividad HIOMT *in vitro*. Nuestros resultados muestran que la actividad de esta enzima en la retina del carpín muestra una oscilación diaria rítmica, con la acrofase en ZT20, y por tanto, desplazada aproximadamente 1 hora respecto a la acrofase de la AANAT en este mismo tejido, y con una menor amplitud. Por tanto, podemos aceptar que el método *in vitro* utilizado para cuantificar la funcionalidad de esta actividad enzimática es válido para los tejidos del carpín. Sin embargo, utilizando este mismo método en regiones del TGI (intestino anterior, intestino posterior e hígado), no hemos podido detectar actividad de la enzima HIOMT. Por tanto, aunque la expresión de *gAanat* y su actividad funcional se han demostrado en el presente estudio, la ausencia de actividad HIOMT funcional en el TGI descarta la hipótesis de una producción local de MEL, sugiriendo que los altos niveles de actividad funcional de la AANAT en el TGI podría estar implicados en otras funciones alternativas a nivel local. Apenas se ha investigado la actividad HIOMT, y en los escasos resultados publicados, esta actividad muestra leves variaciones a lo largo del ciclo de 24 h en la retina (Gern et al., 1984, Nowak et al., 1993, Zawilska et al., 2006). La actividad HIOMT ocular se ha estudiado previamente en la trucha arco iris (Gern et al., 1984) donde, al igual que la enzima del carpín, también sigue una cinética de Michaelis-Menten respecto a la S-(50-adenosyl)-L-metionina, pero difiere en la cinética respecto a la N-acetilserotonina, que es de tipo

IV. DISCUSIÓN

Michaelis-Menten en la trucha y muestra una inhibición por sustrato en el carpín. Hasta el momento actual, sólo se ha investigado la actividad HIOMT en tejidos periféricos en un único trabajo realizado en el hígado de rata, donde los niveles de actividad publicados son del mismo orden de magnitud que los de la actividad AANAT (Sanchez-Hidalgo et al., 2009).

Habiendo descartado la posibilidad de una producción local de MEL en el TGI, nos planteamos profundizar en posibles funciones alternativas para la enzima AANAT, buscando, en primer lugar, la identificación de la isoforma predominante de esta enzima en el TGI del carpín. En este teleósteo, además de la *gAanat-2* (Velarde et al., 2010a), se ha clonado recientemente la *gAanat-1*, cuya expresión se ha encontrado en la retina, hígado, intestino anterior y posterior, pero no en la pineal (Velarde et al., resultados no publicados). En la presente Tesis Doctoral, hemos encontrado que tiramina y dopamina compiten con la triptamina como sustratos alternativos en las reacciones del ensayo *in vitro*, en la retina, el intestino y el hígado, pero no en la pineal. Esta preferencia de sustratos de la AANAT en el intestino y la retina coincide con la esperada para la isoforma AANAT1, y además, la afinidad de la AANAT por la dopamina en el intestino del carpín es similar a la descrita para esta enzima en la retina de la dorada y el pez cebra (Zilberman-Peled et al., 2006), por lo que la AANAT1 sería la isoforma predominantemente activa en el TGI del carpín, donde podría acetilar DA en un intervalo μM . Aunque no existen datos en la actualidad que cuantifiquen el contenido de DA intracelular en neuronas entéricas dopaminérgicas, como hemos visto en otra parte de esta Memoria, esta concentración de DA tiene una acción estimuladora de la motilidad intestinal, por lo que podrían encontrarse similares concentraciones extracelulares de esta catecolamina en el intestino de este teleósteo.

Esta potencial capacidad de acetilación de dopamina adscrita a la AANAT del TGI del carpín se ha confirmado, en la presente Tesis Doctoral, mediante la cuantificación de la producción de N-acetildopamina en el TGI. De manera complementaria, para confirmar que la acetilación de la dopamina es catalizada por la AANAT, se han utilizado dos agentes inhibidores para detener la producción de N-acetildopamina: el ácido fólico, inhibidor específico de la arilamina N-acetiltransferas (ANAT); y la CoA-S-N-acetilriptamina, específico de la arilalkilamina N-acetiltransferase (AANAT). En el hígado observamos una inhibición completa de la producción de N-acetildopamina en presencia del inhibidor de la AANAT (que también inhibe la formación de N-acetylriptamina, Velarde et al., resultados aún no publicados). Por tanto, podemos concluir que la actividad de la enzima AANAT en el

hígado del carpín está implicada entre otras, en la regulación del metabolismo de la dopamina.

2.2. Dopamina y motilidad intestinal en el carpín: Distribución de receptores dopaminérgicos y mecanismo de acción de la dopamina.

A partir de los resultados obtenidos en el estudio anterior, nos propusimos profundizar en el conocimiento de los posibles efectos que la dopamina y su derivado N-acetilado podrían ejercer en el intestino del carpín. Un resultado relevante de la presente Tesis Doctoral es la demostración, por primera vez en los peces, de un efecto de la dopamina en la motilidad intestinal. Mientras que la N-acetildopamina no modifica la contractilidad intestinal, al menos en las condiciones de baño de órganos utilizadas por nosotros, el análisis concentración/respuesta para la dopamina revela un efecto dual para esta catecolamina, con leves acciones contráctiles observadas a $1\mu\text{M}$ y robustas relajaciones con concentraciones más altas (10 y $100\mu\text{M}$). El papel de la dopamina como regulador entérico de la motilidad intestinal se ha investigado en mamíferos (Anlauf et al., 2003, Kirschstein et al., 2009) y en aves (Lot, 1993), no existiendo información en otros vertebrados. Los estudios en mamíferos revelan que el efecto dual de la dopamina en la contractilidad intestinal parece estar relacionado con la región concreta del TGI investigada. Así, las contracciones parecen ir asociadas a regiones anteriores (Kirschstein et al., 2009; Lot 1993), mientras que los efectos relajantes se observan principalmente en regiones posteriores (Aguilar et al., 2005, Boselli et al., 1987, Grivegneet et al., 1984, Lot, 1993, Lucchelli et al., 1986, Lucchelli et al., 1990), siendo mayor la relajación cuanto más distal es la región estudiada (Kirschstein et al., 2009).

De manera similar a los resultados publicados en la rata (Kirschstein et al., 2009), el efecto de la dopamina en el control de la motilidad intestinal del carpín muestra una diferente temporalidad, siendo la contracción una respuesta rápida que ocurre en menos de 1 minuto, mientras que la relajación es una respuesta más lenta, tardando aproximadamente el doble en generar el efecto.

Tras esta caracterización general de la acción de la dopamina en la motilidad intestinal, nos centramos en el efecto relajante identificando, en primer lugar, los subtipos de receptores involucrados en esta respuesta. El hecho de que la relajación inducida por dopamina se bloquee con un antagonista específico de receptores dopaminérgicos del tipo D_1 , pero no se vea afectado por el antagonista de receptores de tipo D_2 , nos lleva a

IV. DISCUSIÓN

proponer que está mediada por receptores de la familia D₁. Estos resultados concuerdan con los únicos estudios existentes en la bibliografía que han investigado esta cuestión en el íleo (Zizzo et al., 2010) y el colon de ratones (Zhang et al., 2012). En estudios previos se ha cuestionado si esta acción de la dopamina es específica, o si por el contrario puede deberse a una activación inespecífica de receptores adrenérgicos. Para descartar esta posibilidad, mediante el bloqueo de los receptores α - y β - adrenérgicos (con yohimbina y propanolol, respectivamente) demostramos que el efecto relajante de la dopamina en el intestino del carpín es específico. Pudiera cuestionarse la efectividad de estos antagonistas generales para bloquear los receptores adrenérgicos intestinales en una preparación de baño de órganos como la utilizada en la presente Tesis Doctoral, sin embargo nuestros ensayos demuestran su efectividad inhibiendo totalmente la relajación inducida experimentalmente por la adición de noradrenalina al baño.

A fin de tener indicios directos que apoyen la especificidad de las acciones de la dopamina en la motilidad intestinal, realizamos un estudio de expresión de los receptores dopaminérgicos en el intestino anterior del carpín (región utilizada en los ensayos de motilidad). Además, para tener una información más precisa de la localización de los receptores, el análisis se llevó a cabo en dos capas distintas de la pared intestinal, la capa muscular conteniendo el plexo mientérico y la capa mucosa-submucosa con el plexo submucoso. La amplia presencia de receptores del tipo D₁ apoya nuestra propuesta de que es éste tipo el implicado en los efectos de la dopamina. Específicamente localizamos expresión de los subtipos D_{1A1} en ambas capas intestinales, mientras que los subtipos D_{1B} y D_{1C} se detectaron sólo en la muscular y en la mucosa-submucosa, respectivamente. EL carpín expresa tres subtipos de receptores dopaminérgicos pertenecientes a la familia D₂, de los que no encontramos expresión de ninguno de los subtipos D_{2B1}, D_{2B1S}, D_{2B1L}, D_{2B2} y D₄ en ninguna de las capa analizadas, hallando expresión del subtipo D_{2A} en la capa mucosa-submucosa y del D₃ en las dos capas estudiadas. La no identificación de receptores del subtipo D_{2B} concuerda con lo publicado previamente en el intestino completo del carpín (Popesku et al., 2011) y de la anguila (Pasqualini et al., 2009), aunque discrepa en relación con el receptor D_{2A}, que no se ha podido identificar en la carpa herbívora (Wang et al., 2011). Los distintos protocolos de PCR empleados podrían justificar estas diferencias (aparte de las diferencias propias de cada especie), estando avalada la validez de los procedimientos empleados en nuestro estudio con la detección de todos los subtipos de receptores en la hipófisis, órgano utilizado como control positivo. Por tanto, otro resultado

relevante de la presente Tesis Doctoral es la identificación, por primera vez, de los cinco subtipos de receptores dopaminérgicos en distintas capas intestinales de un teleósteo. Sería muy interesante completar esta parte del estudio con aproximaciones farmacológicas que, mediante el uso de agonistas y antagonistas específicos de los distintos subtipos, nos permitieran caracterizar la funcionalidad de los mismos. Sin embargo, en la actualidad no se dispone de agonistas y antagonistas comerciales para los diferentes subtipos de receptores dopaminérgicos de los peces.

Identificados y localizados los subtipos de receptores dopaminérgicos en distintas capas intestinales del carpín, nuestro objetivo fue investigar potenciales mediadores de la acción relajante de la dopamina en la motilidad intestinal. La primera diana elegida fue el óxido nítrico por varias razones, por un lado debido a la existencia de un tono nitrérgico inhibidor de la motilidad intestinal en teleósteos (Karila y Holmgren, 1995, Holmberg et al., 2006), incluyendo el carpín (Velarde et al., 2011a), por otro en base a la densa inervación nitrérgica descrita a lo largo del tracto digestivo de esta especie (Brüning et al., 1996), y además porque otros agentes relajantes como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y su homólogo, el péptido activador de adenilato ciclasa hipofisario (PACAP) están presentes en células que contienen óxido nítrico sintetasa (Murthy, 2006). Sin embargo, la inhibición específica de la óxido nítrico sintetasa en la preparación intestinal del carpín no alteró la relajación inducida por dopamina. Teniendo presente que VIP/PACAP estimulan la síntesis de óxido nítrico en células del músculo liso, y que éste gas actúa activando la cascada de GMPc, nos planteamos inhibir la guanilato ciclasa, pero esta aproximación tampoco contrarrestó la relajación inducida por dopamina, por lo que podemos afirmar que el efecto relajante dopaminérgico es independiente del óxido nítrico. Una conclusión similar se ha publicado para la relajación inducida por dopamina en el íleon del ratón (Zizzo et al., 2010), como tampoco resultó ser el mediador de la relajación inducida por MEL en preparaciones intestinales de carpín estimuladas con acetilcolina (Verlarde et al., 2011a). Nuestros resultados también descartan a la ruta de señalización intracelular que implica al AMP cíclico como mediadora de la relajación dopaminérgica en el carpín, ya que el inhibidor específico de la adenilato ciclasa no modifica la acción de la dopamina en la motilidad intestinal, a diferencia de lo que se demostró en el íleon de ratón (Zizzo et al., 2010). Por tanto, descartadas estas vías de señalización intracelular, las posibles aproximaciones a realizar en el futuro a fin de dilucidar los mecanismos intracelulares subyacentes a la relajación inducida por dopamina incluyen el uso, por ejemplo, de

IV. DISCUSIÓN

bloqueantes específicos de canales iónicos con fármacos como la apamina, que selectivamente bloquea canales de potasio de conductancia reducida activados por calcio, que parecen desempeñar un papel crucial en el mantenimiento de la inhibición de la contracción intestinal en los mamíferos (Sanders, 2008), pudiendo ser ésta una posible ruta de activación tras la estimulación del receptor D₁.

Puesto que la contracción espontánea intestinal depende mayoritariamente de la activación colinérgica nos propusimos descartar que la relajación dopaminérgica esté mediada por este sistema colinérgico. Ni la dopamina alteró la contracción inducida por acetilcolina, ni la adición de atropina al baño de órganos modificó la relajación dopaminérgica, por lo que a partir de estos resultados afirmamos que la relajación intestinal inducida por dopamina, a diferencia del efecto relajante de la noradrenalina (Olsson y Holmgren, 2011), se produce por un mecanismo no colinérgico.

En este afán por caracterizar posibles mediadores de las acciones de la dopamina en la motilidad intestinal del carpín, pensamos en la posibilidad de que los receptores de tipo D₁ implicados pudieran estar situados en la abundante población de interneuronas presentes en la pared intestinal, ya que la contracción espontánea del músculo liso intestinal en peces depende de terminaciones nerviosas, siendo reducida notablemente por el tratamiento con tetrodotoxina (Olsson y Holmgren, 2011). Los ensayos realizados utilizando esta neurotoxina demuestran que en la relajación dopaminérgica (insensible a la tetrodotoxina) no intervienen interneuronas, de manera similar a lo descrito previamente en íleon y colon de roedores (Zizzo et al., 2010; Zhang et al., 2012), confirmando acciones directas de la dopamina sobre receptores D₁ localizados en el músculo liso intestinal.

Por último, y teniendo presente resultados previos de nuestro grupo de investigación en los que se demuestra que la contracción serotoninérgica intestinal, aunque depende en parte de una estimulación colinérgica, amplifica el ritmo miógeno basal en preparaciones tratadas con atropina (Velarde et al., 2010b), nos planteamos averiguar si la dopamina podría actuar regulando el control serotoninérgico. Los resultados obtenidos muestran que el pretratamiento con dopamina contrarresta parcialmente la contracción inducida por serotonina, lo que podría justificarse por una acción directa de ambos neurotransmisores en las células de músculo liso de la pared intestinal.

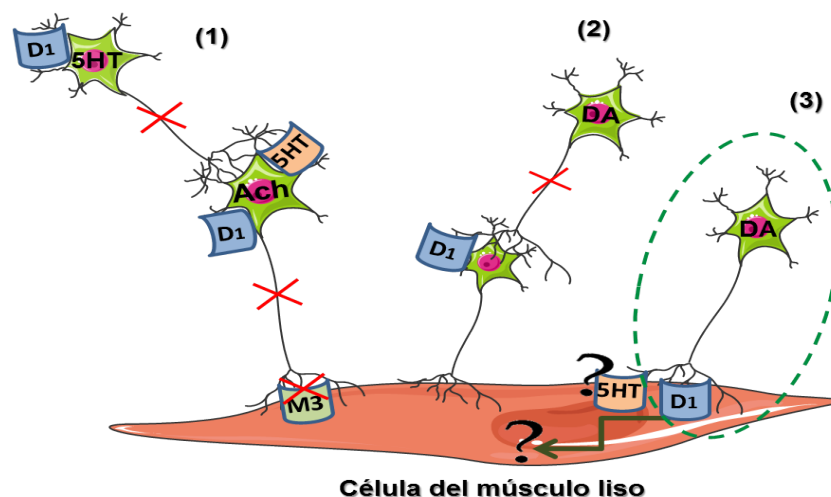


Figura 13. Representación esquemática de las hipótesis presentadas en el presente estudio de posibles vías de acción de la dopamina (DA). (1) El hipotético efecto de la DA sobre vías colinérgicas y/o serotoninérgicas para inhibiendo la contracción producir relajación, o la posibilidad de que este efecto esté mediado por otras interneuronas (2). Según los resultados obtenidos en esta Tesis estas dos primeras hipótesis se descartarían. Sugerimos que el receptor dopaminérgico estaría localizado directamente en el músculo liso (3), y que la interacción observada de la DA con la serotonina (5HT) podría estar ocurriendo también directamente en el músculo. La relajación dopaminérgica está mediada por un receptor del tipo D_1 , pero la cascada de señalización intracelular no se ha resuelto aún.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral proponemos las siguientes conclusiones:

1. El intestino posterior del carpín muestra el perfil molecular básico de expresión de genes reloj propio de un oscilador circadiano periférico que se sincroniza *in vivo* a dos *zeitbebers*, fotoperiodo y horario de alimentación, siendo la alimentación un potente sincronizador del reloj intestinal. Existe un control diferencial de cada uno de estos factores ambientales sobre la expresión de los genes *gPer1a*, *gPer2a*, *gPer3* y *gCry3*.
2. En el intestino posterior del carpín, los genes *gPer1a*, *gPer2a* y *gCry3* anticipan tanto la llegada de la luz como del alimento, siempre que la entrada de esta información se produzca de forma rítmica. Sin embargo, la sincronización del ritmo diario de *gPer3* parece depender más del horario de alimentación.
3. La disponibilidad de alimento, aunque se produzca de forma aleatoria, también puede actuar como factor sincronizador del oscilador intestinal en el carpín. Proponemos que el intestino del carpín es muy sensible a la señal de entrada del alimento, ya que un retraso de 12 horas en el horario de administración anula el ritmo de los genes reloj sincronizados por el alimento.
4. Las hormonas orexigénicas, orexina y ghrelina, pueden funcionar como señales endógenas de entrada al sistema circadiano de peces, ya que inducen la expresión de genes reloj pertenecientes al bucle negativo (*Per*) en osciladores centrales (hipotálamo) y periféricos (intestino anterior e hígado) implicados en la regulación de la ingesta.
5. Las interacciones encontradas entre orexina, ghrelina y NPY apoyan la existencia de una interacción funcional entre reguladores orexigénicos centrales y periféricos en el carpín, que podría participar en la señalización anticipatoria a la llegada del alimento.
6. El hecho de que el tratamiento subcrónico con orexina sea capaz de sincronizar el ritmo diario de actividad locomotora en el carpín en ausencia de *zeitgebers* externos, e induzca un aumento de actividad exploratoria pre-ingesta nos permite sugerir que este péptido puede estar implicado en la activación del FEO. La ghrelina también parece estar implicada en el establecimiento de la FAA en el carpín, porque el bloqueo de sus receptores impide la manifestación de esta conducta anticipatoria.

V. CONCLUSIONES

7. Los ritmos diarios con acrofases nocturnas de las actividades AANAT e HIOMT en la retina del carpín *in vitro* demuestran la biosíntesis ocular de melatonina en este teleósteo. Sin embargo, aunque existen niveles elevados de actividad AANAT en intestino anterior e hígado, su falta de ritmicidad diaria significativa y la no detección de actividad HIOMT en estas localizaciones periféricas descarta la producción gastrointestinal de MEL, sugiriendo otras funciones alternativas para la AANAT.
8. Los estudios cinéticos de competencia por distintos sustratos y las aproximaciones farmacológicas empleadas sugieren que la isoforma predominante de la enzima AANAT del TGI del carpín es la AANAT1.
9. Los elevados niveles de actividad funcional *in vitro* de la AANAT en hígado e intestino del carpín, entre otras posibles funciones, parecen estar implicados en procesos de acetilación de la dopamina intestinal, regulando el contenido de dopamina y N-acetildopamina del TGI.
10. La dopamina ejerce una acción dual en la motilidad intestinal del carpín, induciendo contracción del músculo liso intestinal a concentraciones bajas y relajación a concentraciones altas. El efecto relajante parece estar mediado por receptores dopaminérgicos del subtipo D₁, situados en células musculares, habiendo descartado la interacción con vías colinérgicas y nitrérgicas, así como la implicación de las rutas de señalización intracelular por nucleótidos cíclicos.

From the results obtained in the present Doctoral Thesis we propose the following conclusions:

1. The goldfish hindgut shows a basic molecular profile of clock genes expression that is typical of a peripheral circadian oscillator. This clock genes expression is synchronized *in vivo* by two *zeitgebers*, daily photocycle and feeding time, being the food a potent synchronizer of the intestinal clock. A different control of each one of these environmental factors over the expression of the genes *gPer1a*, *gPer2a*, *gPer3* and *gCry3* is reported.
2. In the goldfish hindgut, the genes *gPer1a*, *gPer2a* and *gCry3* anticipate the arrival of both light and food, when the input of this information is produced in a rhythmic way. However, the synchronization of *gPer3* daily rhythm seems to mainly depend on feeding time.
3. Food availability, even when it occurs randomly, can also act as a synchronizer of goldfish intestinal oscillator. Then, we suggest that goldfish intestine is highly sensitive to feeding inputs signals, since feeding 12-h shifted is able to abolish the clock genes rhythms entrained by feeding time.
4. The orexigenic hormones, orexin and ghrelin, can function as endogenous input signals, since they induce the expression of clock genes from the negative loop (*Per*) in central (hypothalamus) and peripheral (foregut and liver) oscillators involved in food intake regulation.
5. The observed interactions among orexin, ghrelin and NPY reinforce the existence of a functional relationship between central and peripheral orexigenic regulators in goldfish. This network could also participate in the signaling of food arrival anticipation.
6. The fact that the sub-chronic treatment with orexin is able to synchronize daily rhythm of locomotor activity in goldfish in the absence of external *zeitgebers*, increasing foraging activity, allow us to suggest that this peptide can be involved in the activation of the FEO. Ghrelin also seems participate in the setting up of FAA in goldfish, since the blockage of its receptors inhibits this anticipatory behaviour.
7. Daily rhythms with nocturnal acrophases of the AANAT and HIOMT activity in goldfish retina demonstrate the ocular biosynthesis of melatonin in this teleost.

V. CONCLUSIONS

However, even if there are elevated levels of AANAT activity in foregut and liver, the absence of a daily rhythm and the non-detectable HIOMT activity in these peripheral locations discards the production of gastrointestinal MEL, and suggests alternative functions to AANAT.

8. Kinetics studies of substrate competition and pharmacological approaches suggest that the main isoform of AANAT enzyme in the goldfish gastrointestinal tract is the AANAT1.
9. The high functional activity of AANAT observed in goldfish liver and foregut *in vitro*, seems to be involved, among other possible functions, in dopamine acetylating process and then, in the regulation of the intestinal content of N-acetyldopamine in the gastrointestinal tract.
10. Dopamine exerts a dual action on intestinal motility in goldfish, inducing contraction of the intestinal smooth muscle at low concentrations, and relaxation at high concentrations. The relaxing effect of DA seems to be mediated by dopaminergic receptors of the D₁-like subtype, directly on muscle cells. It is discarded the interaction with cholinergic and nitrergic pathways, as well as the involvement of the intracellular signalling pathways by cyclic nucleotides.

VI. RESUMEN GENERAL / GENERAL SUMMARY

Resumen general

La presente Tesis Doctoral aborda el estudio de la interacción entre la regulación de la ingesta y el sistema circadiano del carpín. La regulación neuroendocrina de la ingesta en este teleósteo, así como la fortaleza de su sistema circadiano son aspectos bien conocidos en este teleósteo. En particular, el conocimiento principal de su sistema circadiano reside en la ritmicidad comportamental en forma de ritmos de actividad locomotora diaria, y en los hallazgos realizados en los últimos cinco años en relación con la expresión rítmica diaria de genes reloj en localizaciones centrales y periféricas. Por tanto, el objetivo general de la presente Tesis ha sido investigar el papel del tracto gastrointestinal (TGI) del carpín como un oscilador del sistema circadiano, y su capacidad para integrar señales externas (fotoperiodo y horario de alimentación) e internas (hormonas orexigénicas). Además, se ha estudiado la posible participación del TGI en la producción de melatonina, hormona clave en el funcionamiento del sistema circadiano, mediante el análisis funcional de las enzimas limitantes de su ruta biosintética.

1. Ciclo luz/oscuridad y horario de alimentación como sincronizadores

Estudios recientes en peces muestran una ritmicidad diaria de genes reloj en localizaciones periféricas, que ha llevado a proponer la existencia de una organización circadiana no jerarquizada de osciladores centrales y periféricos. Así, la primera parte de la Tesis se ha enfocado al estudio del intestino anterior como candidato a oscilador periférico en el carpín, mediante el análisis de la posible funcionalidad de los factores ambientales en la sincronización de la ritmicidad diaria de los genes reloj *Per1a*, *Per2a*, *Per3* y *Cry3* en este tejido. Con este objetivo se han realizado dos diseños experimentales. Por un lado, para investigar la posible sincronización al ciclo luz/oscuridad, los peces recibieron alimentación en horario aleatorio (para anular la sincronización por un horario fijo de alimentación) y se mantuvieron bajo las siguientes 4 distintas condiciones de iluminación, fotoperiodos 12L:12D y 12D:12L, exposición a luz constante (24L) y a constante oscuridad (24D). Por otro lado, para estudiar el posible efecto del horario de alimentación en la ritmicidad de la expresión de genes reloj, los carpines se mantuvieron bajo las siguientes condiciones de alimentación: alimentación con horario fijo a las 10:00 h (SF10) o a las 22:00 h (SF22) y alimentación aleatoria. A fin de investigar si el horario de la última comida es capaz de resetear los genes reloj en el intestino, a un grupo de carpines

VI. RESUMEN

aclimatados a comer a las 10:00 h durante todo el periodo de experimentación, se les desfasó el horario 12 h, de modo que fueron alimentados a las 22:00 h. En todos los experimentos los peces se sacrificaron durante un ciclo diario completo (24h) en intervalos de 6 horas, y la expresión de genes reloj en el intestino se cuantificó con PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados obtenidos muestran que los genes reloj *gPer1a*, *gPer2a*, and *gCry3* en el intestino del carpín se sincronizan a ambos *zeitgebers*, el fotociclo diario y el régimen horario de alimentación. Además, estos genes reloj anticipan el horario de encendido de las luces y la llegada del alimento, siempre que estos factores estén presentes de forma cíclica. La ritmicidad de *gCry3* y *gPer2a* desaparece en ausencia de ambos *zeitgebers*. Por el contrario, el ritmo de *gPer1* se mantiene en general (aunque no siempre) en condiciones de luz constante (24L) y alimentación aleatoria, sugiriendo que la llegada del alimento aleatoriamente es capaz de resetear el reloj dependiendo de otros factores, como las condiciones energéticas y metabólicas de los peces. El hecho de que la expresión de *gPer2a* no se active durante la fase luminosa del fotociclo sugiere que el intestino posterior del carpín no es un órgano fotosensible directo. Este gen es el único que mantiene la ritmicidad diaria bajo ambas condiciones constantes, de oscuridad (24D) y de luz (24L), aunque con una amplitud menor a la observada en presencia de un fotoperiodo. Estos resultados indican que, aunque la acrofase del ritmo de expresión de *gPer3* parece estar conducida por el horario de alimentación, la interacción de ambos *zeitgebers*, horario de alimentación y condiciones de iluminación, es quien regula su expresión. En conclusión, los resultados presentes indican: (1) el intestino del carpín puede sincronizarse in vivo tanto por el horario de alimentación como por el fotociclo; (2) el alimento es una señal potente que sincroniza este oscilador periférico; y (3) ambos factores ambientales parecen actuar sobre diferentes elementos del reloj molecular.

2. Hormonas orexigénicas (orexina y ghrelina) como sincronizadores endógenos.

En los mamíferos se ha sugerido la existencia de una interacción entre el sistema circadiano y algunos reguladores endógenos de la ingesta. Sin embargo, en la actualidad desconocemos si esta posible e interesante interacción existe en los peces. En la presente Tesis se ha investigado el papel de dos hormonas orexigénicas, orexina y ghrelina, en el funcionamiento del sistema circadiano del carpín. Para desarrollar este objetivo se realizó

un primer diseño experimental en el que los peces se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo 12L:12D y eran alimentados diariamente a las 10:00 h (ZT2). Se administró orexina (2.8 pmol/g pc) intracerebroventricularmente, y ghrelina (gGRL_[1-19]) (44pmol/g pc) y un antagonista de los receptores de ghrelina ([D-Lys³]-GHRP-6, 100 pmol/g pc) intraperitonealmente. Transcurridas 1 y 3 horas de la inyección (ZT7 y ZT9, respectivamente) se muestrearon tejidos centrales y periféricos para la cuantificación posterior por PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de expresión del ARNm de NPY y orexina en el hipotálamo (en los peces inyectados con ghrelina) y de ghrelina en el intestino anterior (en los peces inyectados con orexina). Además, en ambos experimentos se cuantificó la expresión de genes reloj en el hipotálamo, intestino anterior, intestino posterior e hígado, registrando la actividad locomotora diaria y la actividad anticipatoria al alimento (FAA). La orexina, como era esperable, estimuló la expresión hipotalámica de NPY, encontrando, por primera vez en peces, que también incrementó la expresión de ghrelina en el intestino anterior. Por otro lado, el tratamiento con ghrelina indujo la expresión hipotalámica de orexina. Estos resultados revelan la existencia de una interacción clave entre reguladores de la ingesta centrales (orexina y NPY hipotalámicos) y periféricos (ghrelina intestinal). Además, la orexina indujo la expresión de genes *Per* en el hipotálamo y el intestino anterior a las 3 horas de su administración. De forma similar, la ghrelina indujo la expresión de genes *Per* en el hipotálamo y el hígado a la hora de la inyección, efecto que se contrarresta con la inyección previa del antagonista de los receptores de ghrelina. En ninguno de los dos estudios encontramos modificaciones de la expresión de *gBmal1a* por los tratamientos experimentales. Todos estos resultados, de forma global, muestran por primera vez en los peces la existencia de una interacción entre hormonas orexigénicas y la maquinaria molecular de osciladores circadianos centrales y periféricos, sugiriendo una posible funcionalidad de estas hormonas como señales de entrada al sistema circadiano del carpín.

Se ha investigado, además, los posibles efectos de estas hormonas en la ritmicidad de la actividad locomotora diaria y la FAA, que constituyen salidas comportamentales del sistema circadiano bien caracterizadas. Con este objetivo se realizó un diseño experimental en el que se inyectó de forma subcrónica (4-10 días, dependiendo del experimento) orexina, ghrelina y un antagonista de los receptores de ghrelina en distintas condiciones ambientales, combinando los *zeitgebers* fotociclo diario y horario de alimentación. Los resultados obtenidos demuestran que la orexina sincroniza la actividad locomotora diaria

VI. RESUMEN

en ausencia de ambos *zeitgebers* (es decir, 24L y ayuno), confirmando que este péptido puede actuar como una señal de salida del sistema circadiano en los peces. La ghrelina no fue capaz de sincronizar la actividad locomotora diaria, al menos en las condiciones experimentales utilizadas, sin embargo el bloqueo de los receptores de ghrelina inhibió significativamente la aparición de la FAA en peces alimentados con horario fijo. Por tanto, la ghrelina no parece estar implicada en la regulación de la actividad locomotora general, pero parece intervenir en el establecimiento de la FAA probablemente interaccionando con otras entradas sincronizadoras de los osciladores sincronizables por el alimento.

3. Funcionalidad de enzimas de la ruta biosintética de melatonina (AANAT e HIOMT) en el tracto gastrointestinal.

La detección de algunas de las enzimas de la ruta biosintética de melatonina, junto a su presencia en el tracto gastrointestinal (GIT) ha llevado a la propuesta de una síntesis local de melatonina en dicho GIT. Sin embargo, la producción de melatonina intestinal es una cuestión aún no resuelta debido, principalmente, a la elevada liposolubilidad de la molécula que garantiza su libre difusión a través de las membranas biológicas. A fin de investigar si esta hipotética síntesis de melatonina gastrointestinal se produce en el carpín, en la presente Tesis doctoral hemos utilizado una aproximación experimental analizando la actividad funcional *in vitro* de las dos últimas enzimas de la ruta biosintética de melatonina (AANAT e HIOMT) en el hígado y el intestino del carpín a lo largo de un ciclo diario completo. Además, en base a la expresión diferencial de las 2 familias de AANATs conocidas, el siguiente objetivo fue determinar cuál es la isoforma funcional predominante en el TGI del carpín, comparando sus características cinéticas con las de la isoforma predominante en la retina.

Para abordar estos objetivos cuantificamos la producción de N-acetiltriptamina en ensayos *in vitro* realizados utilizando triptamina como sustrato y acetil coenzima-A como donante de acetilo, identificando la actividad AANAT durante un ciclo diario completo en intestino anterior, intestino posterior, hígado y retina (como control positivo de producción de melatonina). La actividad HIOMT se cuantificó a partir de la melatonina formada en ensayos *in vitro* en presencia de N-acetilserotonina y S-(5'-adenosil)-L-metionina. Los dos productos de las reacciones enzimáticas se cuantificaron por HPLC con detección de fluorescencia. Nuestros resultados revelan la existencia de oscilaciones

diarias en la actividad funcional AANAT de todos los tejidos analizados, que resultaron ser rítmicas únicamente en la retina y el intestino anterior, con acrofases situadas en la fase oscura del fotociclo diario (ZT $19,2 \pm 0,4$ y $15,9 \pm 1,3$, respectivamente). La actividad funcional HIOMT sólo se detectó en la retina, descartando por tanto, la hipotética síntesis de melatonina en el TGI del carpín. Además, nuestros resultados demuestran, por primera vez en el carpín, la existencia de un perfil rítmico diario de actividad HIOMT en la retina, con la acrofase desplazada 1 hora respecto a la encontrada para el perfil diario de AANAT en la retina de este teleósteo. La no detección de actividad HIOMT funcional en el hígado y el intestino, motivó la búsqueda de posibles sustratos alternativos para la AANAT del intestino como otra opción funcional de esta enzima en este tejido. Encontramos que la dopamina (DA) compite con la triptamina e inhibe la producción de N-acetiltriptamina en retina, intestino e hígado, sugiriendo que la isoforma activa en el intestino es la AANAT1. Además, tanto el intestino como el hígado producen N-acetildopamina en presencia de la acetil-coenzima A y la DA como sustratos, producción que no se anula por el ácido fólico (inhibidor específico de arilamina N-acetiltransferasa) en ninguno de los tejidos, pero que se inhibe totalmente en presencia de CoA-S-N-acetiltryptamina (inhibidor de la arilalquilamina N-acetiltransferasa, AANAT) en el hígado. Por tanto, a partir de todos estos resultados proponemos que la AANAT1 parece ser una enzima clave en la regulación del contenido de DA y N-acetildopamina en el hígado. Finalmente, por primera vez en los peces, encontramos un efecto de la DA regulando la motilidad intestinal, confirmando un papel fisiológico más amplio de la AANAT en el intestino del carpín.

4. Dopamina y motilidad del intestino anterior en peces.

Se ha demostrado que la DA regula funciones digestivas y la motilidad intestinal en los mamíferos, no existiendo apenas estudios en este sentido en los vertebrados no mamíferos. Esta última parte de la Tesis Doctoral se ha dirigido a investigar el posible papel fisiológico de la DA como candidato a regulador de la motilidad en el carpín utilizando un sistema *in vitro* de baño de órganos acoplado a un transductor isométrico. Así mismo, estudiamos la presencia de receptores dopaminérgicos en el TGI y las rutas de señalización intracelular que potencialmente pudieran estar implicadas en estas acciones de la DA.

VI. RESUMEN

Hemos encontrado un efecto dual de la DA *in vitro*, consistente en la inducción de una respuesta contráctil a concentraciones bajas (1 μ M), y relajaciones a concentraciones más altas (10 y 100 μ M). Con objeto de identificar los subtipos de receptores implicados en la relajación dopaminérgica y su especificidad, utilizamos una aproximación farmacológica con antagonistas de los receptores dopaminérgicos D₁ y D₂ (R(+)-SCH23390 y domperidona, respectivamente), y antagonistas de los receptores α - y β -adrenérgicos (yohimbina y propranolol, respectivamente). El hecho de que la relajación inducida por DA se bloquee totalmente con los antagonistas de receptores D₁ revela que la acción relajante dopaminérgica está mediada específicamente por los receptores de la familia D₁-like. Con técnicas de PCR investigamos el patrón de distribución de los distintos subtipos de receptores en distintas regiones del intestino anterior, encontrando que los subtipos D_{1a1}, D_{1b}, D_{1c}, D_{2a} y D₃ muestran una distribución diferencial en la región muscular-serosa y en las capas mucosa-submucosa, reforzando la conclusión anterior en relación con las acciones específicas de la DA sobre la motilidad intestinal en este teleosteo. El efecto relajante de la DA no es bloqueado por la adición al medio de inhibidores de la óxido nítrico sintetasa, de la acenilato ciclasa ni de la guanilato ciclasa (N ω -nitro-L-arginina metil éster, and 2',3', dideoxiadenosina, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona, respectivamente). El hecho de que el efecto relajante de la DA no se vea modificado por la preincubación con tetrodotoxina (bloqueante de canales de Na⁺ dependientes de voltaje), ni por el antagonista general de receptores muscarínicos (atropina) indica que esta acción se ejerce de forma directa en las células musculares. Finalmente, encontramos que la DA altera la estimulación de la contractilidad intestinal inducida por serotonina pero no la inducida por acetilcolina, lo que sugiere que el efecto relajante de la DA, independiente del control colinérgico, interacciona con la regulación serotoninérgica directamente a nivel de las células musculares. Por tanto, a partir de todos estos resultados podemos afirmar que la DA induce relajación en el intestino anterior del carpín, probablemente actuando de forma directa en las células musculares a través de la activación de receptores del tipo D₁-like utilizando un mecanismo independiente del nucleótidos cíclicos, del óxido nítrico y de la innervación colinérgica, pero interactuando con la regulación serotoninérgica intestinal.

De modo global los resultados obtenidos en la presente Tesis doctoral apuntan a la importancia del TGI en el sistema circadiano del carpín, y confirman la existencia en peces

de una interacción bidireccional entre el sistema que mantiene una "homeostasis temporal" en el organismo con diversos reguladores de la ingesta. Por un lado, los genes reloj en el intestino se sincronizan al fotoperiodo y, al menos en ausencia de éste, también a la hora de alimentación. Por otro, dos hormonas orexigénicas, la orexina y la ghrelina (ésta última sintetizada principalmente en el intestino anterior del carpín) modulan la expresión de genes reloj a nivel central (hipotálamo) y periférico (intestino y/o hígado). Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral sugieren que el TGI, además de recibir señales de entrada procedentes del ciclo luz-oscuridad y del ciclo ingesta-ayuno, podría ser a su vez un nodo en la red de osciladores periféricos generador de salidas rítmicas, que potencialmente modularían otros osciladores periféricos y centrales, respuestas comportamentales (ciclo diario de actividad locomotora), y funciones gastrointestinales (motilidad). En este sentido, sugerimos que la enzima AA-NAT, clásicamente relacionada con la síntesis de melatonina, y cuya expresión está regulada por el oscilador molecular, podría intervenir en el control de otras funciones intestinales independientes de la indolamina.

General Summary

The present Doctoral Thesis approaches the study of the interaction of food intake regulation and the circadian system of goldfish. In this teleost is well described the neuroendocrine regulation of food intake, as well as the robustness of its circadian system. The main knowledge of its circadian system is based on the well known behavioral patterns, as daily locomotor activity, but also through the recently described rhythmic expression of clock genes in different central and peripheral tissues. Therefore, the aim of the present Thesis was to investigate the role of the gastrointestinal tract (GIT) of goldfish as an oscillator of the circadian system, and its capacity of integrating exogenous (photoperiod and feeding time) and endogenous cues (orexigenic hormones). In addition, it has been studied the putative participation of the GIT in the melatonin production, a key hormone in the time signaling of the circadian system, by means of the functional analysis of the limiting enzymes in its biosynthetic pathway.

1. Light/dark cycle and feeding time as entrainment factors of the hindgut peripheral oscillator.

Recent studies in fish show a daily rhythmicity of clock genes in peripheral locations, what had led to suggest a non-hierarchical circadian organization of central and peripheral oscillators. Then, the first part of the present Thesis was focused in the study of the hindgut as a candidate for a peripheral oscillator in goldfish, through the investigation of the capacity of environmental cues to synchronize the daily rhythm of clock genes *Per1a*, *Per2a*, *Per3* y *Cry3* in this tissue. For that purpose, two experimental designs were carried out. On one hand, to study the possible synchronization to the light/day cycle, fish randomly fed (to avoid synchronization by feeding time) were held under four different lightening conditions: photoperiods 12L:12D and 12D:12L and exposure to constant light (24L) and to constant darkness (24D). On the other hand, to study the possible effect of feeding time on the rhythmicity of clock genes expression, fish were maintained under different feeding conditions: scheduled feeding at 10:00 h (SF10) or at 22:00 h (SF22) and random feeding. In order to investigate if the time of the last food supply is able to reset the clock genes in hindgut, a group of fish was schedule fed at 10:00h during all the acclimatization period, with a 12-h shift in the last day (being fed at 22:00 h). Fish were sacrificed in all experiments throughout a 24 h cycle at 6-h intervals, and the expression of

VI. GENERAL SUMMARY

clock genes in hindgut was quantified using Real Time qPCR. Results show the clock genes *gPer1a*, *gPer2a*, and *gCry3* are synchronized by both *zeitgebers*, the photocycle and feeding regime, in goldfish hindgut. Moreover, such clock genes anticipate lights-on and food delivery, when these cues appear in a cyclic manner. The *gCry3* and *gPer2a* rhythmicity disappeared in the absence of both *zeitgebers*. In contrast, the *gPer1* rhythm was usually (but not always) maintained under 24L and random feeding conditions, suggesting that randomly supplied food is able to reset the clock depending on other factors, as the fish energy and metabolic conditions. The *gPer2a* expression was not activated during the light phase of the photocycle, suggesting the hindgut of goldfish is a non-direct photosensitive organ. In contrast to the other three genes, *gPer3* expression in the goldfish hindgut seemed to be dependent on the timing of the last food delivery, even in the presence of a photocycle. This gene was the only one that maintained daily rhythms under both constant lighting conditions (24D and 24L), although with lower amplitude than when a photocycle was present. This indicates that, although the acrophase (peak time) of the *gPer3* expression rhythm seems to be driven by feeding time, there is an interaction of both *zeitgebers*, time of food and lighting conditions, to regulate its expression. In conclusion, present data indicate: (1) the hindgut of goldfish can be synchronized *in vivo* by both the photocycle and feeding time; (2) food is a potent signal that entrains this peripheral oscillator; and (3) both environmental cues seems to target different elements of the molecular clock.

2. Orexigenic hormones (orexin and ghrelin) as endogenous synchronizers of the circadian system.

An interaction between the circadian system and some endogenous feeding regulators was suggested in mammals. However nothing is known to date about this interesting issue in fish. In the present Thesis it was investigated the role of two orexigenic hormones, orexin and ghrelin, in the functionality of the circadian system of goldfish. In the first experimental design carried out to this approach, fish were held under a 12L:12D photoperiod and daily fed at 10:00 h (ZT2). Orexin (2.8 pmol/g bw) was ICV administrated, while ghrelin (gGRL_[1-19]) (44pmol/g bw) and ghrelin receptors antagonist ([D-Lys³]-GHRP-6, 100 pmol/g bw) was IP administrated. At 1 and 3-h post injection (ZT7 y ZT9, respectively) central and peripheral tissues were sampled and the mRNA expression of

VI. GENERAL SUMMARY

hypothalamic NPY and orexin (in ghrelin injected fish), and the mRNA expression of foregut ghrelin (in orexin injected fish) was quantified using Real Time qPCR. Besides, in both studies clock genes expression was quantified in hypothalamus, foregut, hindgut and liver, and daily locomotor activity and food anticipatory activity (FAA) were registered. As expected, orexin stimulated the NPY hypothalamic expression, and for the first time in fish, increased the ghrelin expression in foregut. On the other hand, ghrelin treatment induced the orexin hypothalamic expression. These results show a key interaction among central (hypothalamic orexin and NPY) and peripheral (intestinal ghrelin) feeding regulators. In addition, orexin induced *Per* genes expression in the hypothalamus and foregut at 3-h post-injection. Similarly, ghrelin induced the expression of *Per* genes in hypothalamus and liver at 1-h post-injection, which is counteracted by the pre-treatment with ghrelin receptors antagonist. In none of both studies the expression of *gBmal1a* was modified by the experimental treatments. Overall, these results show for the first time an interaction between orexigenic hormones and the molecular clockwork of circadian oscillators (central and peripheral) in fish, suggesting a possible function of these hormones as input signals of the circadian system in goldfish.

The possible effects of these hormones on a well-known behavioral output of the circadian system, as the daily locomotor activity rhythmicity and FAA was also investigated. For this purpose sub-chronic (from 4-10 days depending on the experiment) injections of orexin, ghrelin or ghrelin receptors antagonist were carried out under different environmental conditions, combining both *zeitgebers* (daily photocycle and feeding time). Orexin synchronizes daily locomotor activity in the absence of both *zeitgebers* (i.e. 24L and fasting conditions), confirming that this peptide can indeed act as an input signal of the circadian system in fish. Ghrelin was not able to synchronize daily locomotor activity under our experimental conditions, however ghrelin receptors antagonist inhibited significantly the setting up of FAA in schedule fed fish. Therefore, ghrelin does not seem to regulate general locomotor activity, but as a signal of nutritional status it could be involved in the establishment of the FAA probably interacting with entrainment inputs to the food-entrained oscillators.

3. Functionality of melatonin synthesizing enzymes (AANAT and HIOMT) in the gastrointestinal tract.

VI. GENERAL SUMMARY

The gastrointestinal tract (GIT) was suggested in many studies to be the source of part of the circulating melatonin, based on the detection of some enzymes of its biosynthetic pathway and/or the quantification of its melatonin content. However, intestinal melatonin production is still an unsolved question, due to its high liposolubility that allows to cross cell membranes and then, to be easily transported throughout the tissues. In the present Thesis a direct approach was addressed in order to investigate the hypothetical gastrointestinal melatonin synthesis, by means of the analysis of the functional activity *in vitro* of the last two enzymes of melatonin biosynthetic pathway (AANAT and HIOMT) in liver and intestine of goldfish throughout a 24-h daily cycle. On the basis of the differential expression of the two family AANATs, the next objective was to identify the predominant functional isoform in the GIT of goldfish, comparing its kinetic characteristics with the ones of the predominant isoform in the retina. Through the quantification of the N-acetyltryptamine production *in vitro*, using tryptamine as substrate in the presence of acetyl coenzyme-A, we identify the AANAT activity in foregut, hindgut, liver and retina (the last one was used as control tissue for melatonin production) collected at 3-h intervals during a 24-h cycle. The HIOMT activity was quantified as the production of melatonin *in vitro* in presence of N-acetylserotonin and S-(5'-adenosyl)-L-methionine. Both products of enzymatic reactions were quantified by HPLC with fluorescence detection. We observed that AANAT was functional in all studied tissues, showing daily oscillations, which were rhythmic in the case of the retina and foregut, with acrophases in the dark period of the photocycle ($ZT\ 19.2 \pm 0.4$ and 15.9 ± 1.3 , respectively). In turn, the HIOMT activity was only detected in the retina, discarding such hypothetical melatonin synthesis in the GIT. In addition, for the first time it was demonstrated a rhythmic profile of HIOMT in goldfish retina, with the acrophase 1 hour after compared to the one exhibited by AANAT in this tissue. The failure to detect functional HIOMT activity in both, liver and gut, led us to investigate other physiological substrates for the AANAT, as dopamine (DA), searching alternative roles for this enzyme in the goldfish gut. DA competes with tryptamine and inhibits retinal, intestinal and hepatic N-acetyltryptamine production, suggesting that the active isoform in gut is AANAT1. Besides, gut and liver produces N-acetyldopamine in presence of acetyl coenzyme-A and DA. This production is not abolished by the presence of folic acid (arylamine N-acetyltransferase inhibitor) in any studied tissue, but a total inhibition occurs in the presence of CoA-S-N-acetyltryptamine (AANAT inhibitor) in liver. Thus, AANAT1 seems to be an important enzyme in the regulation of DA

and N-acetyldopamine content in liver. Finally, for the first time in fish we found that DA regulates the gut motility, emphasizing a broad physiological role of AANAT in the goldfish gut.

4. Dopamine and foregut motility in goldfish.

It is demonstrated that DA regulates digestive functions and intestinal motility in mammals, but studies in non-mammalian vertebrates are scarce. Therefore, this last part of the Thesis was focused to investigate the putative physiological role of DA as regulator of foregut motility in goldfish by the use of an *in vitro* organ bath system coupled to an isometric force transducer. The presence of dopaminergic receptors, and the intracellular signaling pathways that could be involved were also studied.

A dual effect of DA *in vitro* was observed, inducing a contraction at low concentration (1 μ M), and relaxations at higher concentrations (10 and 100 μ M). To identify the receptor subtypes involved in the dopaminergic relaxation we used specific antagonist for D₁ and D₂ dopaminergic receptors (R(+)-SCH23390 and domperidone, respectively), and antagonist for α - and β - adrenergic receptors (yohimbine and propranolol, respectively). DA-induced relaxation was totally blocked by D₁ receptor antagonist, showing that this DA effect is specifically mediated by D₁-like receptors. The distribution pattern of DA receptor subtypes in different layers of the foregut was studied by PCR. We found that D_{1a1}, D_{1b}, D_{1c}, D_{2a}, and D₃ receptor subtypes are differently distributed in the muscular-serosa and mucosa-submucosa layers, reinforcing that DA effect on foregut motility is specifically mediated by dopaminergic receptors. The relaxing effect of DA was not blocked by inhibitors of nitric oxide synthase, adenylyl cyclase and guanylyl cyclase enzymes (N ω -Nitro-L-arginine methyl ester, and 2',3', dideoxyadenosine, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, respectively). In addition, DA relaxing effect seems to be exerted directly on muscle cell, since it is insensitive to both, a voltage-dependent Na⁺ channel blocker (tetrodotoxin) and to a muscarinic receptor antagonist (atropine). Finally, serotonergic but not cholinergic-induced contraction was affected by DA, suggesting that its relaxing effect is independent of the cholinergic control of foregut motility but it likely interacts with the serotonergic regulation directly on muscle cells. In summary, DA induces relaxation in goldfish foregut, probably acting directly on muscle cells via D₁-like

VI. GENERAL SUMMARY

receptors through a cAMP-, cGMP- oxide nitric- and cholinergic-independent mechanism, but interacting with the serotonergic regulation.

In general, the results obtained in this Doctoral Thesis point to the relevance of the GIT in the circadian system of goldfish, and confirm the existence of a bidirectional crosstalking between the system that maintains the time organization in the organism and several feeding regulators in fish. On one hand, clock genes in the hindgut are synchronized by photoperiod, and at least in the absence of a light/dark cycle, they are also synchronized by feeding time. On the other hand, orexigenic hormones as orexin and ghrelin (this last one mainly synthesized in goldfish foregut), modulate the expression of clock genes at central (hypothalamus) and peripheral level (foregut and/or liver). In addition, results from the present Thesis also suggest that besides of inputs from light/dark cycle and feeding/fasting, the GIT could also be a node of new rhythmic outputs that would modulate others central and peripheral oscillators as well as behavioral responses (daily cycle of locomotor activity), and digestive functions (intestinal motility). Concerning this last function, we suggest a novel role for the oscillator-driven AANAT enzyme (classically related with melatonin synthesis) that could be involved in the regulation of intestinal functions, independently of melatonin.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, M., Volkoff, H., 2011. Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) in goldfish (*Carassius auratus*): role in the regulation of feeding and locomotor behaviors and interactions with the orexin system and cocaine- and amphetamine regulated transcript (CART). *Horm Behav.* 59, 236-245.
- Adeghate, E., Fernandez-Cabezudo, M., Hameed, R., El-Hasasna, H., El Wasila, M., Abbas, T., et al., 2010. Orexin-1 receptor co-localizes with pancreatic hormones in islet cells and modulates the outcome of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *PLoS One.* 5, e8587.
- Aguilar, M.J., Estan, L., Martinez-Mir, I., Martinez-Abad, M., Rubio, E., Morales-Olivas, F.J., 2005. Effects of dopamine in isolated rat colon strips. *Can J Physiol Pharmacol.* 83, 447-452.
- Akiyama, M., Yuasa, T., Hayasaka, N., Horikawa, K., Sakurai, T., Shibata, S., 2004. Reduced food anticipatory activity in genetically orexin (hypocretin) neuron-ablated mice. *Eur J Neurosci.* 20, 3054-3062.
- Al-Hussaini, A.H., 1949. On the functional morphology of the alimentary tract of some fish in relation to differences in their feeding habits; anatomy and histology. *Q J Microsc Sci.* 90 Pt. 2, 109-139.
- Albrecht, U., 2012. Circadian rhythms and sleep—the metabolic connection. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology.* 463, 23-30.
- Amiya, N., Amano, M., Oka, Y., Iigo, M., Takahashi, A., Yamamori, K., 2007. Immunohistochemical localization of orexin/hypocretin-like immunoreactive peptides and melanin-concentrating hormone in the brain and pituitary of medaka. *Neurosci Lett.* 427, 16-21.
- Amole, N., Unniappan, S., 2009. Fasting induces preproghrelin mRNA expression in the brain and gut of zebrafish, *Danio rerio*. *Gen Comp Endocrinol.* 161, 133-137.
- Anderson, C., Campbell, G., 1988. Immunohistochemical study of 5-HT-containing neurons in the teleost intestine: relationship to the presence of enterochromaffin cells. *Cell and Tissue Research.* 254, 553-559.
- Anlauf, M., Schafer, M.K., Eiden, L., Weihe, E., 2003. Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J Comp Neurol.* 459, 90-111.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Appa, R., Raza, B., Prasad, J., Razi, S., Gottardo, L., Ahmad, M., et al., 2001. Melatonin decreases glucocorticoid blood concentration in the rat and palm squirrel, acting directly on the adrenal gland. *Biomed Res.* 22, 115-117.
- Appelbaum, L., Anzulovich, A., Baler, R., Gothilf, Y., 2005. Homeobox-Clock Protein Interaction in Zebrafish: A shared mechanism for pineal-specific and circadian gene expression. *Journal of Biological Chemistry.* 280, 11544-11551.
- Appelbaum, L., Wang, G.X., Maro, G.S., Mori, R., Tovin, A., Marin, W., et al., 2009. Sleep-wake regulation and hypocretin-melatonin interaction in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 21942-21947.
- Aranda, A., Madrid, J.A., Sanchez-Vazquez, F.J., 2001. Influence of light on feeding anticipatory activity in goldfish. *J Biol Rhythms.* 16, 50-57.
- Arendt, J., Skene, D.J., 2005. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev.* 9, 25-39.
- Asakawa, A., Inui, A., Fujimiya, M., Sakamaki, R., Shinfuku, N., Ueta, Y., et al., 2005. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut.* 54, 18-24.
- Aschoff, J., A Survey on Biological Rhythms. In: J. Aschoff, (Ed.), *Biological Rhythms*, Springer US1981, pp. 3-10.
- Azpeleta, C., 2013. Melatonina en la regulación de las respuestas al estrés en teleósteos. Efectos comportamentales y acciones en el eje hipotálamo-hipófisis-interrenal.
- Azpeleta, C., Martinez-Alvarez, R.M., Delgado, M.J., Isorna, E., De Pedro, N., 2010. Melatonin reduces locomotor activity and circulating cortisol in goldfish. *Horm Behav.* 57, 323-329.
- Azpeleta, S.-B.A., Isorna E, Nisembaum LG, Velarde E, De Pedro N, et al. , 2012. Understanding the circadian system as a net of clocks: daily expression of clock genes in the hypothalamus-pituitary-interrenal axis in *Carassius Auratus*. In: Delgado MJ, Alonso-Gómez AL, de Pedro N and Isorna E, editors. *Avances en Endocrinología Comparada Vol VI*. Servicio de Publicaciones de la Universidad Complutense de Madrid; . p.37-40.
- Balsalobre, A., 2002. Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* 309, 193-199.
- Balsalobre, A., Brown, S.A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M., et al., 2000. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science.* 289, 2344-2347.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Barker, N., van Es, J.H., Jaks, V., Kasper, M., Snippert, H., Toftgard, R., et al., 2008. Very long-term self-renewal of small intestine, colon, and hair follicles from cycling Lgr5+ve stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 73, 351-356.
- Barnea, M., Madar, Z., Froy, O., 2010. High-fat diet followed by fasting disrupts circadian expression of adiponectin signaling pathway in muscle and adipose tissue. *Obesity (Silver Spring).* 18, 230-238.
- Bass, J., Takahashi, J.S., 2010. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science.* 330, 1349-1354.
- Bayarri, M.a.J., Rol de Lama, M.a.Á., Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J., 2003. Both pineal and lateral eyes are needed to sustain daily circulating melatonin rhythms in sea bass. *Brain Research.* 969, 175-182.
- Bayarri, M.J., Iigo, M., Muñoz-Cueto, J.A., Isorna, E., Delgado, M.J., Madrid, J.A., et al., 2004. Binding characteristics and daily rhythms of melatonin receptors are distinct in the retina and the brain areas of the European sea bass retina (*Dicentrarchus labrax*). *Brain Research.* 1029, 241-250.
- Beattie, D.T., Smith, J.A., 2008. Serotonin pharmacology in the gastrointestinal tract: a review. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 377, 181-203.
- Benyassi, A., Schwartz, C., Coon, S.L., Klein, D.C., Falcon, J., 2000. Melatonin synthesis: arylalkylamine N-acetyltransferases in trout retina and pineal organ are different. *Neuroreport.* 11, 255-258.
- Bernard, M., Klein, D.C., Zatz, M., 1997. Chick pineal clock regulates serotonin N-acetyltransferase mRNA rhythm in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 304-309.
- Besharse, J.C., Iuvone, P.M., 1983. Circadian clock in *Xenopus* eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. *Nature.* 305, 133-135.
- Besseau, L., Benyassi, A., Moller, M., Coon, S.L., Weller, J.L., Boeuf, G., et al., 2006. Melatonin pathway: breaking the 'high-at-night' rule in trout retina. *Exp Eye Res.* 82, 620-627.
- Blum, I.D., Patterson, Z., Khazall, R., Lamont, E.W., Sleeman, M.W., Horvath, T.L., et al., 2009. Reduced anticipatory locomotor responses to scheduled meals in ghrelin receptor deficient mice. *Neuroscience.* 164, 351-359.
- Boeuf, G., Le Bail, P.-Y., 1999. Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture.* 177, 129-152.
- Bonnavion, P., de Lecea, L., 2010. Hypocretins in the control of sleep and wakefulness. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 10, 174-179.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Bonnefont-Rousselot, D., Collin, F., 2010. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*. 278, 55-67.
- Boselli, C., Lucchelli, A., Grana, E., 1987. Receptors involved in the dopamine-induced relaxation of the isolated rat ileum. *Pharmacological Research Communications*. 19, 953-956.
- Boutrel, B., Kenny, P.J., Specio, S.E., Martin-Fardon, R., Markou, A., Koob, G.F., et al., 2005. Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102, 19168-19173.
- Breves, J.P., Veillette, P.A., Specker, J.L., 2009. Ghrelin in the summer flounder: immunolocalization to the gastric glands and action on plasma cortisol levels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 152, 268-272.
- Broglio, F., Gottero, C., Arvat, E., Ghigo, E., 2003. Endocrine and non-endocrine actions of ghrelin. *Horm Res*. 59, 109-117.
- Brown, S.A., Zumbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N., Schibler, U., 2002. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr Biol*. 12, 1574-1583.
- Brüning, G., Hattwig, K., Mayer, B., 1996. Nitric oxide synthase in the peripheral nervous system of the goldfish, *Carassius auratus*. *Cell and Tissue Research*. 284, 87-98.
- Bubenik, G.A., Brown, G.M., 1997. Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of rats. *Biol Signals*. 6, 40-44.
- Bubenik, G.A., Hacker, R.R., Brown, G.M., Bartos, L., 1999. Melatonin concentrations in the luminal fluid, mucosa, and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract. *J Pineal Res*. 26, 56-63.
- Bubenik, G.A., Konturek, S.J., 2011. Melatonin and aging: prospects for human treatment. *J Physiol Pharmacol*. 62, 13-19.
- Bubenik, G.A., Pang, S.F., 1997. Melatonin Levels in the Gastrointestinal Tissues of Fish, Amphibians, and a Reptile. *General and Comparative Endocrinology*. 106, 415-419.
- Buijs, R.M., Kalsbeek, A., 2001. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci*. 2, 521-526.
- Burnstock, G., 1958. The Effect of Drugs on Spontaneous Motility and on Response to Stimulation of the Extrinsic Nerves of the Gut of a Teleostean Fish. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*. 13, 216-226.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Burris, T.P., 2008. Nuclear hormone receptors for heme: REV-ERB α and REV-ERB β are ligand-regulated components of the mammalian clock. *Mol Endocrinol.* 22, 1509-1520.
- Caamaño-Tubío, R.I., Pérez, J., Ferreiro, S., Aldegunde, M., 2007. Peripheral serotonin dynamics in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* 145, 245-255.
- Cahill, G.M., Besharse, J.C., 1989. Retinal melatonin is metabolized within the eye of *xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 1098-1102.
- Cahill, G.M., Besharse, J.C., 1991. Resetting the circadian clock in cultured *Xenopus* eyecups: regulation of retinal melatonin rhythms by light and D2 dopamine receptors. *J Neurosci.* 11, 2959-2971.
- Cahill, G.M., Besharse, J.C., 1993. Circadian clock functions localized in *xenopus* retinal photoreceptors. *Neuron.* 10, 573-577.
- Cahill, L.M., Murdoch, B.E., Theodoros, D.G., 2002. Perceptual analysis of speech following traumatic brain injury in childhood. *Brain Inj.* 16, 415-446.
- Cambras Riu, T., 2006. Propiedades fundamentales de los ritmos circadianos. En: *Cronobiología básica y clínica* (Eds.: J.A. Madrid y M.A. Rol de Lama). Editec@Red, Madrid, España. . Cap. 4, 151-189.
- Carlini, V.P., Monzon, M.E., Varas, M.M., Cagnolini, A.B., Schioth, H.B., Scimonelli, T.N., et al., 2002. Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 299, 739-743.
- Carneiro, B.T., Araujo, J.F., 2009. The food-entrainable oscillator: a network of interconnected brain structures entrained by humoral signals? *Chronobiol Int.* 26, 1273-1289.
- Carneiro, B.T., Araujo, J.F., 2012. Food entrainment: major and recent findings. *Front Behav Neurosci.* 6, 83.
- Carrillo-Vico, A., Reiter, R.J., Lardone, P.J., Herrera, J.L., Fernandez-Montesinos, R., Guerrero, J.M., et al., 2006. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Investig Drugs.* 7, 423-431.
- Cassone, V.M., 1990. Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci.* 13, 457-464.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Cavallari, N., Frigato, E., Vallone, D., Frohlich, N., Lopez-Olmeda, J.F., Foa, A., et al., 2011. A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. *PLoS Biol.* 9, e1001142.
- Cazaméa-Catalan, D., Magnanou, E., Helland, R., Vanegas, G., Besseau, L., Boeuf, G., et al., 2012. Functional diversity of Teleost arylalkylamine N-acetyltransferase-2: is the timezyme evolution driven by habitat temperature? *Molecular Ecology.* 21, 5027-5041.
- Chemelli, R.M., Willie, J.T., Sinton, C.M., Elmquist, J.K., Scammell, T., Lee, C., et al., 1999. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell.* 98, 437-451.
- Chong, N.W., Bernard, M., Klein, D.C., 2000. Characterization of the chicken serotonin N-acetyltransferase gene. Activation via clock gene heterodimer/E box interaction. *J Biol Chem.* 275, 32991-32998.
- Chung, S., Son, G.H., Kim, K., 2011. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochim Biophys Acta.* 1812, 581-591.
- Confente, F., Rendón, M.C., Besseau, L., Falcón, J., Muñoz-Cueto, J.A., 2010. Melatonin receptors in a pleuronectiform species, *Solea senegalensis*: Cloning, tissue expression, day-night and seasonal variations. *General and Comparative Endocrinology.* 167, 202-214.
- Coon, S.L., Begay, V., Deurloo, D., Falcon, J., Klein, D.C., 1999. Two arylalkylamine N-acetyltransferase genes mediate melatonin synthesis in fish. *J Biol Chem.* 274, 9076-9082.
- Coon, S.L., Klein, D.C., 2006. Evolution of arylalkylamine N-acetyltransferase: emergence and divergence. *Mol Cell Endocrinol.* 252, 2-10.
- Coon, S.L., Roseboom, P.H., Baler, R., Weller, J.L., Namboodiri, M.A., Koonin, E.V., et al., 1995. Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science.* 270, 1681-1683.
- Cummings, D.E., Overduin, J., 2007. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest.* 117, 13-23.
- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., Weigle, D.S., 2001. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes.* 50, 1714-1719.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., Schibler, U., 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14, 2950-2961.
- Date, Y., Ueta, Y., Yamashita, H., Yamaguchi, H., Matsukura, S., Kangawa, K., et al., 1999. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 748-753.
- Davidson, A.J., 2006. Search for the feeding-entrainable circadian oscillator: a complex proposition. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 290, R1524-R1526.
- Davie, A., Minghetti, M., Migaud, H., 2009. Seasonal variations in clock-gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Chronobiol Int.* 26, 379-395.
- Davis, R.E., 1964. Daily “predawn” peak of locomotion in fish. *Animal Behaviour.* 12, 272-283.
- Davis, R.E., Bardach, J.E., 1965. Time-co-ordinated prefeeding activity in fish. *Animal Behaviour.* 13, 154-162.
- De Pedro N, B.T., B., 2001. Regulation of food intake by neuropeptides and hormones. En: Food intake in fish (Ed. Houlihan D, Boujard T, Jobling M). Blackwell Science. Oxford (UK).. pp. 269-296
- De Pedro, N., Martinez-Alvarez, R.M., Delgado, M.J., 2008. Melatonin reduces body weight in goldfish (*Carassius auratus*): effects on metabolic resources and some feeding regulators. *J Pineal Res.* 45, 32-39.
- Deguchi, T., 1992. Physiology and molecular biology of arylamine Nacetyltransferases. . *Biomed Res* 13:, 231-242.
- Delgado, M.J., Vivien-Roels, B., 1989. Effect of environmental temperature and photoperiod on the melatonin levels in the pineal, lateral eye, and plasma of the frog, *Rana perezi*: importance of ocular melatonin. *Gen Comp Endocrinol.* 75, 46-53.
- Dickmeis, T., Weger, B.D., Weger, M., 2013. The circadian clock and glucocorticoids – Interactions across many time scales. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 380, 2-15.
- Dixit, V.D., Schaffer, E.M., Pyle, R.S., Collins, G.D., Sakthivel, S.K., Palaniappan, R., et al., 2004. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest.* 114, 57-66.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Dominguez, L., Morona, R., Joven, A., Gonzalez, A., Lopez, J.M., 2010. Immunohistochemical localization of orexins (hypocretins) in the brain of reptiles and its relation to monoaminergic systems. *J Chem Neuroanat.* 39, 20-34.
- Dornonville de la Cour, C., Lindstrom, E., Norlen, P., Hakanson, R., 2004. Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regul Pept.* 120, 23-32.
- Dube, M.G., Kalra, S.P., Kalra, P.S., 1999. Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. *Brain Res.* 842, 473-477.
- Dubocovich, M.L., Markowska, M., 2005. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine.* 27, 101-110.
- Elias, C.F., Saper, C.B., Maratos-Flier, E., Tritos, N.A., Lee, C., Kelly, J., et al., 1998. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol.* 402, 442-459.
- Escobar, C., Cailotto, C., Angeles-Castellanos, M., Delgado, R.S., Buijs, R.M., 2009. Peripheral oscillators: the driving force for food-anticipatory activity. *Eur J Neurosci.* 30, 1665-1675.
- Escobar, C., Martínez-Merlos, M.T., Angeles-Castellanos, M., Del Carmen Miñana, M., Buijs, R.M., 2007. Unpredictable feeding schedules unmask a system for daily resetting of behavioural and metabolic food entrainment. *European Journal of Neuroscience.* 26, 2804-2814.
- Facciolo, R.M., Crudo, M., Giusi, G., Alo, R., Canonaco, M., 2009. Light- and dark-dependent orexinergic neuronal signals promote neurodegenerative phenomena accounting for distinct behavioral responses in the teleost *Thalassoma pavo*. *J Neurosci Res.* 87, 748-757.
- Facciolo, R.M., Crudo, M., Zizza, M., Giusi, G., Canonaco, M., 2011. Feeding behaviors and ORXR- β -GABA A R subunit interactions in *Carassius auratus*. *Neurotoxicology and teratology.* 33, 641-650.
- Fadel, J., Deutch, A.Y., 2002. Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience.* 111, 379-387.
- Falcon, J., 1999. Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog Neurobiol.* 58, 121-162.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Falcón, J., 1999. Cellular circadian clocks in the pineal. *Progress in Neurobiology*. 58, 121-162.
- Falcon, J., Besseau, L., Fuentes, M., Sauzet, S., Magnanou, E., Boeuf, G., 2009. Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates. *Ann N Y Acad Sci*. 1163, 101-111.
- Falcon, J., Besseau, L., Sauzet, S., Boeuf, G., 2007a. Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. *Trends Endocrinol Metab*. 18, 81-88.
- Falcon, J., Besseau, L., Sauzet, S., Fuentes, M., Boeuf, G., 2007b. [Melatonin and neuroendocrine regulations in fish]. *J Soc Biol*. 201, 21-29.
- Falcón, J., Bolliet, V., Collin, J., 1996. Partial characterization of serotonin N - acetyltransferases from northern pike (*Esox lucius*, L. pineal organ and retina: effects of temperature. *Pflügers Archiv*. 432, 386-393.
- Falcon, J., Galarneau, K.M., Weller, J.L., Ron, B., Chen, G., Coon, S.L., et al., 2001. Regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase-2 (AANAT2, EC 2.3.1.87) in the fish pineal organ: evidence for a role of proteasomal proteolysis. *Endocrinology*. 142, 1804-1813.
- Falcon, J., Gothilf, Y., Coon, S.L., Boeuf, G., Klein, D.C., 2003. Genetic, temporal and developmental differences between melatonin rhythm generating systems in the teleost fish pineal organ and retina. *J Neuroendocrinol*. 15, 378-382.
- Falcón, J., Migaud, H., Muñoz-Cueto, J.A., Carrillo, M., 2010. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*. 165, 469-482.
- Faraco, J.H., Appelbaum, L., Marin, W., Gaus, S.E., Mourrain, P., Mignot, E., 2006. Regulation of hypocretin (orexin) expression in embryonic zebrafish. *J Biol Chem*. 281, 29753-29761.
- Feighner, S.D., Howard, A.D., Prendergast, K., Palyha, O.C., Hreniuk, D.L., Nargund, R., et al., 1998. Structural Requirements for the Activation of the Human Growth Hormone Secretagogue Receptor by Peptide and Nonpeptide Secretagogues. *Molecular Endocrinology*. 12, 137-145.
- Feillet, C.A., 2010. Food for thoughts: feeding time and hormonal secretion. *J Neuroendocrinol*. 22, 620-628.
- Feillet, C.A., Ripperger, J.A., Magnone, M.C., Dulloo, A., Albrecht, U., Challet, E., 2006. Lack of food anticipation in *Per2* mutant mice. *Curr Biol*. 16, 2016-2022.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Feliciano, A., Vivas, Y., de Pedro, N., Delgado, M.J., Velarde, E., Isorna, E., 2011. Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *J Biol Rhythms*. 26, 24-33.
- Feng, K., Zhang, G.R., Wei, K.J., Xiong, B.X., 2013. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogenetic expression of ghrelin and regulation of expression by fasting and refeeding in the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*. 319, 202-212.
- Fernández-Durán, B., Ruibal, C., Polakof, S., Ceinos, R.M., Soengas, J.L., Míguez, J.M., 2007. Evidence for arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT2) expression in rainbow trout peripheral tissues with emphasis in the gastrointestinal tract. *General and Comparative Endocrinology*. 152, 289-294.
- Forgan, L.G., Forster, M.E., 2007. Effects of potential mediators of an intestinal brake mechanism on gut motility in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 146, 343-347.
- Froy, O., 2010. Metabolism and circadian rhythms--implications for obesity. *Endocr Rev*. 31, 1-24.
- Froy, O., Chapnik, N., 2007. Circadian oscillation of innate immunity components in mouse small intestine. *Mol Immunol*. 44, 1954-1960.
- Fu, Z., Kato, H., Kotera, N., Noguchi, T., Sugahara, K., Kubo, T., 2001. Regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 65, 2504-2511.
- Fujii, R., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kawamata, Y., Habata, Y., Hinuma, S., et al., 2000. Identification of neuromedin U as the cognate ligand of the orphan G protein-coupled receptor FM-3. *J Biol Chem*. 275, 21068-21074.
- Fujimiya, M., Itoh, E., Kihara, N., Yamamoto, I., Fujimura, M., Inui, A., 2000. Neuropeptide Y induces fasted pattern of duodenal motility via Y(2) receptors in conscious fed rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 278, G32-38.
- Fuller, P.M., Lu, J., Saper, C.B., 2008. Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms. *Science*. 320, 1074-1077.
- Furuse, M., Ando, R., Bungo, T., Ao, R., Shimojo, M., Masuda, Y., 1999. Intracerebroventricular injection of orexins does not stimulate food intake in neonatal chicks. *Br Poult Sci*. 40, 698-700.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Gaildrat, P., Becq, F., Falcón, J., 2002. First cloning and functional characterization of a melatonin receptor in fish brain: a novel one? *Journal of Pineal Research*. 32, 74-84.
- Gastel, J.A., Roseboom, P.H., Rinaldi, P.A., Weller, J.L., Klein, D.C., 1998. Melatonin Production: Proteasomal Proteolysis in Serotonin N-Acetyltransferase Regulation. *Science*. 279, 1358-1360.
- Gauer, F., Poirel, V.J., Garidou, M.L., Simonneaux, V., Pevet, P., 1999. Molecular cloning of the arylalkylamine-N-acetyltransferase and daily variations of its mRNA expression in the Syrian hamster pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res*. 71, 87-95.
- Gern, W.A., Wechsler, E., Duvall, D., 1984. Characteristics and non-rhythmicity of retinal hydroxyindole-O-methyltransferase activity in trout (*Salmo gairdneri*). *General and comparative endocrinology*. 53, 169-178.
- Gershon, M.D., Tack, J., 2007. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*. 132, 397-414.
- Gibbs, F.P., Vriend, J., 1981. The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology*. 109, 1796-1798.
- Girotti, M., Weinberg, M.S., Spencer, R.L., 2009. Diurnal expression of functional and clock-related genes throughout the rat HPA axis: system-wide shifts in response to a restricted feeding schedule. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 296, E888-897.
- Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S.A., Morris, D.G., McGee, P., Fairclough, P., et al., 2002. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 87, 2988.
- Green, C.B., Takahashi, J.S., Bass, J., 2008. The Meter of Metabolism. *Cell*. 134, 728-742.
- Grivegnee, A.R., Fontaine, J., Reuse, J., 1984. Effect of dopamine on dog distal colon in-vitro. *J Pharm Pharmacol*. 36, 454-457.
- Guan, X.M., Yu, H., Palyha, O.C., McKee, K.K., Feighner, S.D., Sirinathsinghji, D.J., et al., 1997. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res*. 48, 23-29.
- Gunapala, K.M., Gallardo, C.M., Hsu, C.T., Steele, A.D., 2011. Single gene deletions of orexin, leptin, neuropeptide Y, and ghrelin do not appreciably alter food anticipatory activity in mice. *PLoS One*. 6, e18377.
- Gutierrez, J.A., Solenberg, P.J., Perkins, D.R., Willency, J.A., Knierman, M.D., Jin, Z., et al., 2008. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 6320-6325.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Hagan, J.J., Leslie, R.A., Patel, S., Evans, M.L., Wattam, T.A., Holmes, S., et al., 1999. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 10911-10916.
- Halasy, K., Benedeczky, I., Fekete, É., Tóth, L., Gabriel, R., 1988. Enteric neuromuscular junctions: Comparison of ultrastructural features in different phylogenetic groups. *Neuroscience.* 25, 147-162.
- Hansen, M.B., 2003. Neurohumoral control of gastrointestinal motility. *Physiol Res.* 52, 1-30.
- Hansen, M.B., Witte, A.B., 2008. The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion. *Acta Physiol (Oxf).* 193, 311-323.
- Hardeland, R., 2008. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci.* 65, 2001-2018.
- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S., 2005. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutrition & Metabolism.* 2, 22.
- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S.R., Poeggeler, B., 2007. Melatonin in plants - focus on a vertebrate night hormone with cytoprotective properties. *Functional Plant Science and Biotechnology.* 1, 32-45.
- Hardeland, R., Poeggeler, B., 2003. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res.* 34, 233-241.
- Hardeland, R., Poeggeler, B., 2007. Actions of Melatonin, Its Structural and Functional Analogs in the Central Nervous System and the Significance of Metabolism. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* (Central Nervous System Agents). 7, 289-303.
- Hastings, M.H., 2000. Circadian clockwork: two loops are better than one. *Nat Rev Neurosci.* 1, 143-146.
- Hastings, M.H., Maywood, E.S., O'Neill, J.S., 2008a. Cellular circadian pacemaking and the role of cytosolic rhythms. *Curr Biol.* 18, R805-R815.
- Hastings, M.H., Maywood, E.S., Reddy, A.B., 2008b. Two Decades of Circadian Time. *Journal of Neuroendocrinology.* 20, 812-819.
- Hastings, M.H., Reddy, A.B., Maywood, E.S., 2003. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 4, 649-661.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Hattori, N., Saito, T., Yagyu, T., Jiang, B.H., Kitagawa, K., Inagaki, C., 2001. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 4284-4291.
- Haynes, A.C., Jackson, B., Overend, P., Buckingham, R.E., Wilson, S., Tadayyon, M., et al., 1999. Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides.* 20, 1099-1105.
- Herrero, M.J., Pascual, M., Madrid, J.A., Sanchez-Vazquez, F.J., 2005. Demand-feeding rhythms and feeding-entrainment of locomotor activity rhythms in tench (*Tinca tinca*). *Physiol Behav.* 84, 595-605.
- Higgins, S.C., Gueorguiev, M., Korbonits, M., 2007. Ghrelin, the peripheral hunger hormone. *Ann Med.* 39, 116-136.
- Hirao, A., Nagahama, H., Tsuboi, T., Hirao, M., Tahara, Y., Shibata, S., 2010. Combination of starvation interval and food volume determines the phase of liver circadian rhythm in *Per2::Luc* knock-in mice under two meals per day feeding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 299, G1045-1053.
- Hirata, F., Hayaishi, O., Tokuyama, T., Seno, S., 1974. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem.* 249, 1311-1313.
- Hoegg, S., Brinkmann, H., Taylor, J.S., Meyer, A., 2004. Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *J Mol Evol.* 59, 190-203.
- Holmberg, A., Olsson, C., Hennig, G.W., 2007. TTX-sensitive and TTX-insensitive control of spontaneous gut motility in the developing zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *J Exp Biol.* 210, 1084-1091.
- Holmberg, A., Olsson, C., Holmgren, S., 2006. The effects of endogenous and exogenous nitric oxide on gut motility in zebrafish *Danio rerio* embryos and larvae. *J Exp Biol.* 209, 2472-2479.
- Holmgren, S., Olsson, C., Chapter 10 The Neuronal and Endocrine Regulation of Gut Function. In: D.G.V.D.K.D.A.P.F. Dr. Nicholas J. Bernier, J.B. Dr. Colin, (Eds.), *Fish Physiology*, Academic Press 2009, pp. 467-512.
- Hoogerwerf, W.A., Hellmich, H.L., Cornelissen, G., Halberg, F., Shahinian, V.B., Bostwick, J., et al., 2007. Clock gene expression in the murine gastrointestinal tract: endogenous rhythmicity and effects of a feeding regimen. *Gastroenterology.* 133, 1250-1260.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Horn, M.H., 1998 Feeding and digestion. En: The physiology of fishes. (Ed.: D.H. Evans). CRC Press, New York. . pp 43-63.
- Horvath, T.L., Diano, S., van den Pol, A.N., 1999. Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci.* 19, 1072-1087.
- Hoskins, L.J., Volkoff, H., 2012. Daily patterns of mRNA expression of two core circadian regulatory proteins, Clock2 and Per1, and two appetite-regulating peptides, OX and NPY, in goldfish (*Carassius auratus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 163, 127-136.
- Hosoya, M., Moriya, T., Kawamata, Y., Ohkubo, S., Fujii, R., Matsui, H., et al., 2000. Identification and Functional Characterization of a Novel Subtype of Neuromedin U Receptor. *Journal of Biological Chemistry.* 275, 29528-29532.
- Howard, A.D., Feighner, S.D., Cully, D.F., Arena, J.P., Liberators, P.A., Rosenblum, C.I., et al., 1996. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science.* 273, 974-977.
- Howard, A.D., Wang, R., Pong, S.S., Mellin, T.N., Strack, A., Guan, X.M., et al., 2000. Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding. *Nature.* 406, 70-74.
- Huang, T.-s., Ruoff, P., Fjellidal, P.G., 2010. Effect of continuous light on daily levels of plasma melatonin and cortisol and expression of clock genes in pineal gland, brain and liver in atlantic salmon postsmolts. *Chronobiology International.* 27, 1715-1734.
- Huesa, G., van den Pol, A.N., Finger, T.E., 2005. Differential distribution of hypocretin (orexin) and melanin-concentrating hormone in the goldfish brain. *The Journal of Comparative Neurology.* 488, 476-491.
- Hunt, T., Sassone-Corsi, P., 2007. Riding tandem: circadian clocks and the cell cycle. *Cell.* 129, 461-464.
- Idda, M.L., Bertolucci, C., Vallone, D., Gothilf, Y., Sanchez-Vazquez, F.J., Foulkes, N.S., 2012. Circadian clocks: lessons from fish. *Prog Brain Res.* 199, 41-57.
- Iigo, M., Furukawa, K., Tabata, M., Aida, K., 2003. Circadian variations of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Neuroscience Letters.* 347, 49-52.
- Iigo, M., Tabata, M., 1996. Circadian rhythms of locomotor activity in the goldfish *Carassius auratus*. *Physiol Behav.* 60, 775-781.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Iijima, M., Yamaguchi, S., van der Horst, G.T.J., Bonnefont, X., Okamura, H., Shibata, S., 2005. Altered food-anticipatory activity rhythm in Cryptochrome-deficient mice. *Neuroscience Research*. 52, 166-173.
- Ikegami, T., Azuma, K., Nakamura, M., Suzuki, N., Hattori, A., Ando, H., 2009. Diurnal expressions of four subtypes of melatonin receptor genes in the optic tectum and retina of goldfish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 152, 219-224.
- Ikegami, T., Motohashi, E., Doi, H., Hattori, A., Ando, H., 2009. Synchronized diurnal and circadian expressions of four subtypes of melatonin receptor genes in the diencephalon of a puffer fish with lunar-related spawning cycles. *Neuroscience Letters*. 462, 58-63.
- Isorna, E., Besseau, L., Boeuf, G., Desdevises, Y., Vuilleumier, R., Alonso-Gomez, A.L., et al., 2006. Retinal, pineal and diencephalic expression of frog arylalkylamine N-acetyltransferase-1. *Mol Cell Endocrinol*. 252, 11-18.
- Isorna, E., El M'rabet, A., Confente, F., Falcon, J., Munoz-Cueto, J.A., 2009. Cloning and expression of arylalkylamine N-acetyltransferase-2 during early development and metamorphosis in the sole *Solea senegalensis*. *Gen Comp Endocrinol*. 161, 97-102.
- Ito, Y., Kuriyama, H., 1971. Nervous Control of the Motility of the Alimentary Canal of the Silver Carp. *Journal of Experimental Biology*. 55, 469-487.
- Iuvone, P.M., Chong, N.W., Bernard, M., Brown, A.D., Thomas, K.B., Klein, D.C., 1999. Melatonin biosynthesis in chicken retina. Regulation of tryptophan hydroxylase and arylalkylamine N-acetyltransferase. *Adv Exp Med Biol*. 460, 31-41.
- Iuvone, P.M., Tosini, G., Pozdeyev, N., Haque, R., Klein, D.C., Chaurasia, S.S., 2005. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retin Eye Res*. 24, 433-456.
- Ivanova, T.N., Iuvone, P.M., 2003. Circadian rhythm and photic control of cAMP level in chick retinal cell cultures: a mechanism for coupling the circadian oscillator to the melatonin-synthesizing enzyme, arylalkylamine N-acetyltransferase, in photoreceptor cells. *Brain Res*. 991, 96-103.
- Johansson, A., Holmgren, S., 2003. Ca²⁺-recruitment in tachykinin-induced contractions of gut smooth muscle from African clawed frog, *Xenopus laevis* and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol*. 131, 185-191.
- Johnson, C.H., Golden, S.S., Ishiura, M., Kondo, T., 1996. Circadian clocks in prokaryotes. *Mol Microbiol*. 21, 5-11.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Jöhren, O., Neidert, S.J., Kummer, M., Dendorfer, A., Dominiak, P., 2001. Prepro-Orexin and Orexin Receptor mRNAs Are Differentially Expressed in Peripheral Tissues of Male and Female Rats. *Endocrinology*. 142, 3324-3331.
- Jonsson, E., 2013. The role of ghrelin in energy balance regulation in fish. *Gen Comp Endocrinol*. 187, 79-85.
- Jonsson, E., Forsman, A., Einarsdottir, I.E., Kaiya, H., Ruohonen, K., Bjornsson, B.T., 2007. Plasma ghrelin levels in rainbow trout in response to fasting, feeding and food composition, and effects of ghrelin on voluntary food intake. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 147, 1116-1124.
- Jonsson, E., Kaiya, H., Bjornsson, B.T., 2010. Ghrelin decreases food intake in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through the central anorexigenic corticotropin-releasing factor system. *Gen Comp Endocrinol*. 166, 39-46.
- Juell, J.E., Bjordal, Å., Fernö, A., Huse, I., 1994. Effect of feeding intensity on food intake and growth of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in sea cages. *Aquaculture Research*. 25, 453-464.
- Kaiya, H., Kangawa, K., Miyazato, M., 2013a. Ghrelin receptors in non-Mammalian vertebrates. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 4, 81.
- Kaiya, H., Kangawa, K., Miyazato, M., 2013b. What is the general action of ghrelin for vertebrates? - comparisons of ghrelin's effects across vertebrates. *Gen Comp Endocrinol*. 181, 187-191.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Moriyama, S., Takahashi, A., Kawauchi, H., et al., 2003a. Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinology*. 144, 5215-5226.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L.G., Hirano, T., Grau, E.G., et al., 2003b. Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. *J Endocrinol*. 176, 415-423.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L.G., Hirano, T., Grau, E.G., et al., 2003c. Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 135, 421-429.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Kaiya, H., Miura, T., Matsuda, K., Miyazato, M., Kangawa, K., 2010. Two functional growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) type 1a and 2a in goldfish, *Carassius auratus*. *Mol Cell Endocrinol.* 327, 25-39.
- Kaiya, H., Small, B.C., Bilodeau, A.L., Shepherd, B.S., Kojima, M., Hosoda, H., et al., 2005. Purification, cDNA cloning, and characterization of ghrelin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Gen Comp Endocrinol.* 143, 201-210.
- Kalsbeek, A., Scheer, F.A., Perreau-Lenz, S., La Fleur, S.E., Yi, C.X., Fliers, E., et al., 2011. Circadian disruption and SCN control of energy metabolism. *FEBS Lett.* 585, 1412-1426.
- Kaneko, M., Hernandez-Borsetti, N., Cahill, G.M., 2006. Diversity of zebrafish peripheral oscillators revealed by luciferase reporting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 14614-14619.
- Kang, K.S., Yahashi, S., Matsuda, K., 2011. The effects of ghrelin on energy balance and psychomotor activity in a goldfish model: an overview. *Int J Pept.* 2011, 171034.
- Kapoor, B.G., Smit, H., Verighina, I.A., 1975. The alimentary canal and digestion in teleost. *Adv. Mar. Biol.* . 13:, 109-230.
- Karila, P., Holmgren, S., 1995. Enteric reflexes and nitric oxide in the fish intestine. *Journal of Experimental Biology.* 198, 2405-2412.
- Karila, P., Shahbazi, F., Jensen, J., Holmgren, S., 1998. Projections and actions of tachykininergic, cholinergic, and serotonergic neurones in the intestine of the atlantic cod. *Cell Tissue Res.* 291, 403-413.
- Kaslin, J., Nystedt, J.M., Ostergard, M., Peitsaro, N., Panula, P., 2004. The orexin/hypocretin system in zebrafish is connected to the aminergic and cholinergic systems. *J Neurosci.* 24, 2678-2689.
- Kezuka, H., Iigo, M., Furukawa, K., Aida, K., Hanyu, I., 1992. Effects of Photoperiod, Pinealectomy and Ophthalmectomy on Circulating Melatonin Rhythms in the Goldfish, *Carassius auratus*(Endocrinology). *Zoological science.* 9, 1047-1053.
- Kiliaan, A.J., Joosten, H.W., Bakker, R., Dekker, K., Groot, J.A., 1989. Serotonergic neurons in the intestine of two teleosts, *Carassius auratus* and *Oreochromis mossambicus*, and the effect of serotonin on transepithelial ion-selectivity and muscle tension. *Neuroscience.* 31, 817-824.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Kirschstein, T., Dammann, F., Klostermann, J., Rehberg, M., Tokay, T., Schubert, R., et al., 2009. Dopamine induces contraction in the proximal, but relaxation in the distal rat isolated small intestine. *Neurosci Lett.* 465, 21-26.
- Kitazawa, T., Hoshi, T., Chugun, A., 1990. Effects of some autonomic drugs and neuropeptides on the mechanical activity of longitudinal and circular muscle strips isolated from the carp intestinal bulb (*Cyprinus carpio*). *Comp Biochem Physiol C.* 97, 13-24.
- Klein, D.C., 2006. Evolution of the vertebrate pineal gland: the AANAT hypothesis. *Chronobiol Int.* 23, 5-20.
- Klein, D.C., 2007. Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". *J Biol Chem.* 282, 4233-4237.
- Klisch, C., Inyushkin, A., Mordel, J., Karnas, D., Pevet, P., Meissl, H., 2009. Orexin A modulates neuronal activity of the rodent suprachiasmatic nucleus in vitro. *Eur J Neurosci.* 30, 65-75.
- Ko, C.H., Takahashi, J.S., 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet.* 15 Spec No 2, R271-277.
- Kobayashi, Y., Ishikawa, T., Hirayama, J., Daiyasu, H., Kanai, S., Toh, H., et al., 2000. Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes Cells.* 5, 725-738.
- Kohsaka, A., Laposky, A.D., Ramsey, K.M., Estrada, C., Joshu, C., Kobayashi, Y., et al., 2007. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab.* 6, 414-421.
- Kojima, K., Kamijo, M., Kageyama, H., Uchiyama, M., Shioda, S., Matsuda, K., 2009. Neuronal relationship between orexin-A- and neuropeptide Y-induced orexigenic actions in goldfish. *Neuropeptides.* 43, 63-71.
- Kojima, M., Haruno, R., Nakazato, M., Date, Y., Murakami, N., Hanada, R., et al., 2000. Purification and identification of neuromedin U as an endogenous ligand for an orphan receptor GPR66 (FM3). *Biochem Biophys Res Commun.* 276, 435-438.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., Kangawa, K., 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 402, 656-660.
- Kojima, M., Hosoda, H., Matsuo, H., Kangawa, K., 2001. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab.* 12, 118-122.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Kojima, M., Kangawa, K., 2005. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev.* 85, 495-522.
- Konturek, P.C., Brzozowski, T., Konturek, S.J., 2011. Gut clock: implication of circadian rhythms in the gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol.* 62, 139-150.
- Kornmann, B., Schaad, O., Reinke, H., Saini, C., Schibler, U., 2007. Regulation of circadian gene expression in liver by systemic signals and hepatocyte oscillators. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 72, 319-330.
- Kottelat, M., Freyhof, J., 2007 *Handbook of European freshwater fishes.* Ed. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof. Berlin, Germany. . pp 78-148.
- Koukkari, W.L., Sothorn, R.B. , 2006 . *Introducing biological rhythms.* Ed. Springer Science + Business Media. Nueva York, Estados Unidos.
- Kovac, J., Husse, J., Oster, H., 2009. A time to fast, a time to feast: the crosstalk between metabolism and the circadian clock. *Mol Cells.* 28, 75-80.
- Kubo, Y., Takeuchi, T., Okano, K., Okano, T., 2010. Cryptochrome genes are highly expressed in the ovary of the African clawed frog, *Xenopus tropicalis*. *PLoS One.* 5, e9273.
- Kulczykowska, E., Kalamarz, H., Warne, J., Balment, R., 2006. Day–night specific binding of 2-[125I]Iodomelatonin and melatonin content in gill, small intestine and kidney of three fish species. *Journal of Comparative Physiology B.* 176, 277-285.
- Kunze, W.A., Furness, J.B., 1999. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol.* 61, 117-142.
- Kuroda, H., Tahara, Y., Saito, K., Ohnishi, N., Kubo, Y., Seo, Y., et al., 2012. Meal frequency patterns determine the phase of mouse peripheral circadian clocks. *Sci Rep.* 2, 711.
- Lamia, K.A., Sachdeva, U.M., DiTacchio, L., Williams, E.C., Alvarez, J.G., Egan, D.F., et al., 2009. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science.* 326, 437-440.
- Lamont, E.W., Bruton, J., Blum, I.D., Abizaid, A., 2013. Ghrelin receptor-knockout mice display alterations in circadian rhythms of activity and feeding under constant lighting conditions. *Eur J Neurosci.*
- Lamont, E.W., Patterson, Z., Rodrigues, T., Vallejos, O., Blum, I.D., Abizaid, A., 2012. Ghrelin-deficient mice have fewer orexin cells and reduced cFOS expression in the mesolimbic dopamine pathway under a restricted feeding paradigm. *Neuroscience.* 218, 12-19.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H., Mori, W., 1958. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes¹. *Journal of the American Chemical Society*. 80, 2587-2587.
- LeSauter, J., Hoque, N., Weintraub, M., Pfaff, D.W., Silver, R., 2009. Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 13582-13587.
- Liu, A.C., Welsh, D.K., Ko, C.H., Tran, H.G., Zhang, E.E., Priest, A.A., et al., 2007. Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell*. 129, 605-616.
- López Patiño, M.A., Alonso-Gómez, A.L., Guijarro, A., Isorna, E., Delgado, M.J., 2008. Melatonin receptors in brain areas and ocular tissues of the teleost *Tinca tinca*: Characterization and effect of temperature. *General and Comparative Endocrinology*. 155, 847-856.
- Lopez-Olmeda, J.F., Madrid, J.A., Sanchez-Vazquez, F.J., 2006. Melatonin effects on food intake and activity rhythms in two fish species with different activity patterns: Diurnal (goldfish) and nocturnal (tench). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 144, 180-187.
- Lopez-Olmeda, J.F., Montoya, A., Oliveira, C., Sanchez-Vazquez, F.J., 2009. Synchronization to light and restricted-feeding schedules of behavioral and humoral daily rhythms in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Chronobiol Int*. 26, 1389-1408.
- López-Olmeda, J.F., Tartaglione, E.V., de la Iglesia, H.O., Sanchez-Vazquez, F.J., 2010. Feeding entrainment of food-anticipatory activity and *per1* expression in the brain and liver of zebrafish under different lighting and feeding conditions. *Chronobiol Int*. 27, 1380-1400.
- López-Patino, M.A., Guijarro, A.I., Isorna, E., Delgado, M.J., Alonso-Bedate, M., de Pedro, N., 1999. Neuropeptide Y has a stimulatory action on feeding behavior in goldfish (*Carassius auratus*). *Eur J Pharmacol*. 377, 147-153.
- López-Patino, M.A., Rodriguez-Illamola, A., Conde-Sieira, M., Soengas, J.L., Miguez, J.M., 2011b. Daily rhythmic expression patterns of *clock1a*, *bmal1*, and *per1* genes in retina and hypothalamus of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Chronobiol Int*. 28, 381-389.
- López-Patino, M.A., Rodriguez-Illamola, A., Gesto, M., Soengas, J.L., Miguez, J.M., 2011a. Changes in plasma melatonin levels and pineal organ melatonin synthesis following

VII. BIBLIOGRAFÍA

- acclimation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different water salinities. *J Exp Biol.* 214, 928-936.
- López, J.M., Domínguez, L., Moreno, N., Morona, R., Joven, A., González, A., 2009. Distribution of Orexin/Hypocretin Immunoreactivity in the Brain of the Lungfishes *Protopterus dolloi* and *Neoceratodus forsteri*. *Brain, Behavior and Evolution.* 74, 302-322.
- Lot, T.Y., 1993. Effects of dopamine on the gastrointestinal tract of chicks. *J Pharm Pharmacol.* 45, 892-895.
- Lucchelli, A., Boselli, C., Chiari, M.C., Grana, E., 1986. Analysis of the relaxing effect of dopamine on the isolated rat jejunum. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 279, 234-247.
- Lucchelli, A., Boselli, C., Grana, E., 1990. Dopamine-induced relaxation of the guinea-pig isolated jejunum is not mediated through dopamine receptors. *Pharmacol Res.* 22, 433-444.
- MacDonald, E.E., Volkoff, H., 2010. Molecular cloning and characterization of preproorexin in winter skate (*Leucoraja ocellata*). *General and Comparative Endocrinology.* 169, 192-196.
- Madrid, J.A., 2006 Los relojes de la vida. Una introducción a la cronobiología. En: *Cronobiología básica y clínica* (Eds.: J.A. Madrid y M.A. Rol de Lama). Editec@Red, Madrid, España. . Cap. 1 39-82.
- Madrid, J.A., Boujard, T., Sánchez-Vázquez, F.J. , 2001 Feeding rhythms. En: *food intake in fish.* (Ed: Houlihan, D.F., Boujard, T. y Jobling, M.). Blackwell Science, Oxford. . 189-215.
- Maeda, H., Yamagata, A., Nishikawa, S., Yoshinaga, K., Kobayashi, S., Nishi, K., et al., 1992. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development.* 116, 369-375.
- Mailliet, F., Ferry, G., Vella, F., Berger, S., Coge, F., Chomarat, P., et al., 2005. Characterization of the melatonergic MT3 binding site on the NRH:quinone oxidoreductase 2 enzyme. *Biochem Pharmacol.* 71, 74-88.
- Marcus, J.N., Aschkenasi, C.J., Lee, C.E., Chemelli, R.M., Saper, C.B., Yanagisawa, M., et al., 2001. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol.* 435, 6-25.
- Marston, O., Williams, R., Canal, M., Samuels, R., Upton, N., Piggins, H., 2008. Circadian and dark-pulse activation of orexin/hypocretin neurons. *Molecular Brain.* 1, 19.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Martin-Robles, A.J., Aliaga-Guerrero, M., Whitmore, D., Pendon, C., Munoz-Cueto, J.A., 2012. The circadian clock machinery during early development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): effects of constant light and dark conditions. *Chronobiol Int.* 29, 1195-1205.
- Martin-Robles, A.J., Isorna, E., Whitmore, D., Munoz-Cueto, J.A., Pendon, C., 2011. The clock gene *Period3* in the nocturnal flatfish *Solea senegalensis*: Molecular cloning, tissue expression and daily rhythms in central areas. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 159, 7-15.
- Masuda, Y., Tanaka, T., Inomata, N., Ohnuma, N., Tanaka, S., Itoh, Z., et al., 2000. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 276, 905-908.
- Matsuda, K., Azuma, M., Kang, K.S., 2012a. Orexin system in teleost fish. *Vitam Horm.* 89, 341-361.
- Matsuda, K., Miura, T., Kaiya, H., Maruyama, K., Shimakura, S., Uchiyama, M., et al., 2006a. Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelins in the goldfish. *Peptides.* 27, 2321-2325.
- Matsuda, K., Miura, T., Kaiya, H., Maruyama, K., Uchiyama, M., Kangawa, K., et al., 2006b. Stimulatory effect of n-octanoylated ghrelin on locomotor activity in the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides.* 27, 1335-1340.
- Matsuda, K., Sakashita, A., Yokobori, E., Azuma, M., 2012b. Neuroendocrine control of feeding behavior and psychomotor activity by neuropeptideY in fish. *Neuropeptides.* 46, 275-283.
- McCowen, K.C., Maykel, J.A., Bistran, B.R., Ling, P.R., 2002. Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *J Endocrinol.* 175, R7-11.
- McKee, K.K., Palyha, O.C., Feighner, S.D., Hreniuk, D.L., Tan, C.P., Phillips, M.S., et al., 1997. Molecular Analysis of Rat Pituitary and Hypothalamic Growth Hormone Secretagogue Receptors. *Molecular Endocrinology.* 11, 415-423.
- MCVAY, J.A., KAAAN, H.W., 1940. The digestive tract of *Carassius auratus*. . *Biol. Bull.* 78: 53-67.
- Mellgren, E.M., Johnson, S.L., 2005. *kitb*, a second zebrafish ortholog of mouse *Kit*. *Dev Genes Evol.* 215, 470-477.
- Mendoza, J., 2007. Circadian clocks: setting time by food. *J Neuroendocrinol.* 19, 127-137.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Mendoza, J., Challet, E., 2009. Brain clocks: from the suprachiasmatic nuclei to a cerebral network. *Neuroscientist*. 15, 477-488.
- Mendoza, J., Drevet, K., Pevet, P., Challet, E., 2008a. Daily meal timing is not necessary for resetting the main circadian clock by calorie restriction. *J Neuroendocrinol*. 20, 251-260.
- Mendoza, J., Pevet, P., Challet, E., 2008b. High-fat feeding alters the clock synchronization to light. *J Physiol*. 586, 5901-5910.
- Messner, M., Huether, G., Lorf, T., Ramadori, G., Schworer, H., 2001. Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract. *Life Sci*. 69, 543-551.
- Mieda, M., Willie, J.T., Hara, J., Sinton, C.M., Sakurai, T., Yanagisawa, M., 2004. Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 4649-4654.
- Migaud, H., Davie, A., Martinez Chavez, C.C., Al-Khamees, S., 2007. Evidence for differential photic regulation of pineal melatonin synthesis in teleosts. *J Pineal Res*. 43, 327-335.
- Mistlberger, R.E., 1994. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*. 18, 171-195.
- Miura, T., Maruyama, K., Kaiya, H., Miyazato, M., Kangawa, K., Uchiyama, M., et al., 2009. Purification and properties of ghrelin from the intestine of the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides*. 30, 758-765.
- Miura, T., Maruyama, K., Shimakura, S., Kaiya, H., Uchiyama, M., Kangawa, K., et al., 2006. Neuropeptide Y mediates ghrelin-induced feeding in the goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci Lett*. 407, 279-283.
- Miura, T., Maruyama, K., Shimakura, S., Kaiya, H., Uchiyama, M., Kangawa, K., et al., 2007. Regulation of food intake in the goldfish by interaction between ghrelin and orexin. *Peptides*. 28, 1207-1213.
- Moran, L.J., Noakes, M., Clifton, P.M., Wittert, G.A., Tomlinson, L., Galletly, C., et al., 2004. Ghrelin and measures of satiety are altered in polycystic ovary syndrome but not differentially affected by diet composition. *J Clin Endocrinol Metab*. 89, 3337-3344.
- Muhlbauer, E., Wolgast, S., Finckh, U., Peschke, D., Peschke, E., 2004. Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett*. 564, 91-96.
- Munoz, J.L., Ceinos, R.M., Soengas, J.L., Miguez, J.M., 2009. A simple and sensitive method for determination of melatonin in plasma, bile and intestinal tissues by high

VII. BIBLIOGRAFÍA

- performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 877, 2173-2177.
- Muroya, S., Funahashi, H., Yamanaka, A., Kohno, D., Uramura, K., Nambu, T., et al., 2004. Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca²⁺ signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *European Journal of Neuroscience.* 19, 1524-1534.
- Murthy, K.S., 2006. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu Rev Physiol.* 68, 345-374.
- Muus, B.J., Dahlström, P., 1981. Los peces de agua dulce de España y Europa. Ed. Omega. Madrid, España. pp 132-135.
- Nader, N., Chrousos, G.P., Kino, T., 2010. Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends Endocrinol Metab.* 21, 277-286.
- Nakamachi, T., Matsuda, K., Maruyama, K., Miura, T., Uchiyama, M., Funahashi, H., et al., 2006. Regulation by Orexin of Feeding Behaviour and Locomotor Activity in the Goldfish. *Journal of Neuroendocrinology.* 18, 290-297.
- Nakamura, K., Kuraoka, A., Kawabuchi, M., Shibata, Y., 1998. Specific localization of gap junction protein, connexin45, in the deep muscular plexus of dog and rat small intestine. *Cell Tissue Res.* 292, 487-494.
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., et al., 2001. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature.* 409, 194-198.
- Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., Hosoya, Y., Yanagisawa, M., Goto, K., 1999. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res.* 827, 243-260.
- Naruse, M., Oishi, T., 1994. Effects of Light and Food as Zeitgebers on Locomotor Activity Rhythms in the Loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Zoological science.* 11, 113-119.
- Naslund, E., Hellstrom, P.M., 2007. Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiol Behav.* 92, 256-262.
- Nelson, W., Tong, Y.L., Lee, J.K., Halberg, F., 1979. Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia.* 6, 305-323.
- Nichikawa, M., Ishibashi, T., 1975. Entrainment of the activity rhythm by the cycle of feeding in the mud-skipper, *Periophthalmus cantonesis* (Osbek). . 84, 184-189.
- Nieuwenhuijs, V.B., Verheem, A., van Duijvenbode-Beumer, H., Visser, M.R., Verhoef, J., Gooszen, H.G., et al., 1998. The role of interdigestive small bowel motility in the

- regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats. *Ann Surg.* 228, 188-193.
- Nisembaum, L.G., Velarde, E., Tinoco, A.B., Azpeleta, C., de Pedro, N., Alonso-Gomez, A.L., et al., 2012. Light-dark cycle and feeding time differentially entrains the gut molecular clock of the goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol Int.* 29, 665-673.
- Noche, R.R., Lu, P.N., Goldstein-Kral, L., Glasgow, E., Liang, J.O., 2011. Circadian rhythms in the pineal organ persist in zebrafish larvae that lack ventral brain. *BMC Neurosci.* 12, 7.
- Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., Beauverger, P., Henlin, J.M., Lefoulon, F., et al., 2000. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem.* 275, 31311-31317.
- Novak, C.M., Levine, J.A., 2009. Daily Intraparaventricular Orexin-A Treatment Induces Weight Loss in Rats. *Obesity.* 17, 1493-1498.
- Nowak, J.Z., Szymanska, B., Zawilska, J.B., Bialek, B., 1993. Hydroxyindole-O-methyltransferase activity in ocular and brain structures of rabbit and hen. *J Pineal Res.* 15, 35-42.
- Ohkubo, T., Boswell, T., Lumineau, S., 2002. Molecular cloning of chicken prepro-orexin cDNA and preferential expression in the chicken hypothalamus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression.* 1577, 476-480.
- Ohno, T., Mochiki, E., Kuwano, H., 2010. The roles of motilin and ghrelin in gastrointestinal motility. *Int J Pept.* 2010.
- Oike, H., Nagai, K., Fukushima, T., Ishida, N., Kobori, M., 2011. Feeding cues and injected nutrients induce acute expression of multiple clock genes in the mouse liver. *PLoS One.* 6, e23709.
- Okamura, H., Yamaguchi, S., Yagita, K., 2002. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res.* 309, 47-56.
- Olsson, C., 2009. Autonomic innervation of the fish gut. *Acta Histochem.* 111, 185-195.
- Olsson, C., Holmberg, A., Holmgren, S., 2008. Development of enteric and vagal innervation of the zebrafish (*Danio rerio*) gut. *J Comp Neurol.* 508, 756-770.
- Olsson, C., Holmgren, S., 2001. The control of gut motility. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 128, 481-503.
- Olsson, C., Holmgren, S., 2011. Autonomic control of gut motility: a comparative view. *Auton Neurosci.* 165, 80-101.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ota, T., Fustin, J.-M., Yamada, H., Doi, M., Okamura, H., 2012. Circadian clock signals in the adrenal cortex. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 349, 30-37.
- Panda, S., Hogenesch, J.B., Kay, S.A., 2002. Circadian rhythms from flies to human. *Nature*. 417, 329-335.
- Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Maestroni, G.J., Cardinali, D.P., Poeggeler, B., Hardeland, R., 2006. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*. 273, 2813-2838.
- Pando, M.P., Pinchak, A.B., Cermakian, N., Sassone-Corsi, P., 2001. A cell-based system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the vertebrate clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 10178-10183.
- Pardini, L., Kaeffer, B., 2006. Feeding and circadian clocks. *Reprod Nutr Dev*. 46, 463-480.
- Parhar, I.S., Sato, H., Sakuma, Y., 2003. Ghrelin gene in cichlid fish is modulated by sex and development. *Biochem Biophys Res Commun*. 305, 169-175.
- Park, J.-G., Park, Y.-J., Sugama, N., Kim, S.-J., Takemura, A., 2007. Molecular cloning and daily variations of the Period gene in a reef fish *Siganus guttatus*. *Journal of Comparative Physiology A*. 193, 403-411.
- Park, Y.-J., Park, J.-G., Kim, S.-J., Lee, Y.-D., Saydur Rahman, M., Takemura, A., 2006. Melatonin receptor of a reef fish with lunar-related rhythmicity: cloning and daily variations. *Journal of Pineal Research*. 41, 166-174.
- Pasqualini, C., Weltzien, F.A., Vidal, B., Baloché, S., Rouget, C., Gilles, N., et al., 2009. Two distinct dopamine D2 receptor genes in the European eel: molecular characterization, tissue-specific transcription, and regulation by sex steroids. *Endocrinology*. 150, 1377-1392.
- Peirson, S.N., Butler, J.N., Duffield, G.E., Takher, S., Sharma, P., Foster, R.G., 2006. Comparison of clock gene expression in SCN, retina, heart, and liver of mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 351, 800-807.
- Pevet, P., 1998. [Melatonin and biological rhythms]. *Thérapie*. 53, 411-420.
- Pevet, P., 2003. Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J Neuroendocrinol*. 15, 422-426.
- Peyric, E., Moore, H.A., Whitmore, D., 2013. Circadian clock regulation of the cell cycle in the zebrafish intestine. *PLoS One*. 8, e73209.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Peyron, C., Tighe, D.K., van den Pol, A.N., de Lecea, L., Heller, H.C., Sutcliffe, J.G., et al., 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci.* 18, 9996-10015.
- Pezuk, P., Mohawk, J.A., Wang, L.A., Menaker, M., 2012. Glucocorticoids as entraining signals for peripheral circadian oscillators. *Endocrinology.* 153, 4775-4783.
- Phillips-Singh, D., Li, Q., Takeuchi, S., Ohkubo, T., Sharp, P.J., Boswell, T., 2003. Fasting differentially regulates expression of agouti-related peptide, pro-opiomelanocortin, prepro-orexin, and vasoactive intestinal polypeptide mRNAs in the hypothalamus of Japanese quail. *Cell and Tissue Research.* 313, 217-225.
- Pinillos, M.L., De Pedro, N., Alonso-Gomez, A.L., Alonso-Bedate, M., Delgado, M.J., 2001. Food intake inhibition by melatonin in goldfish (*Carassius auratus*). *Physiol Behav.* 72, 629-634.
- Pittendrigh, C.S., 1993. Temporal organization – reflections of a darwinian clock-watcher. *Annual Review of Physiology.* 55, 16-54.
- Popesku, J.T., Navarro-Martin, L., Trudeau, V.L., 2011. Evidence for alternative splicing of a dopamine D2 receptor in a teleost. *Physiol Biochem Zool.* 84, 135-146.
- Prober, D.A., Rihel, J., Onah, A.A., Sung, R.J., Schier, A.F., 2006. Hypocretin/orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in zebrafish. *J Neurosci.* 26, 13400-13410.
- Quay, W.B., UAY, W.B., , Ma, Y.H., 1976 Demonstration of gastrointestinal hydroxyindole-Omethyltransferase. *Int. Rep. Clin. Sci. Med. Sci. Lib.* . 4:, 563-569.
- Randall, D., Burggren, W., French, K., 2002. Eckert: Animal Physiology (mechanisms and adaptations). 5^a Ed. W. H. Freeman, New York. Cap. 15 pp 683-724.
- Reebs, S.G., Lague, M., 2000. Daily food-anticipatory activity in golden shiners: A test of endogenous timing mechanisms. *Physiology & Behavior.* 70, 35-43.
- Reiter, R.J., 1991. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol.* 79, C153-158.
- Reiter, R.J., 1993. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia.* 49, 654-664.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., 2003. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res.* 58, 10-19.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., 2001. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol.* 63, 647-676.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Reppert, S.M., Weaver, D.R., 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 418, 935-941.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., Godson, C., 1996. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci*. 17, 100-102.
- Ribeiro, A.C., LeSauter, J., Dupre, C., Pfaff, D.W., 2009. Relationship of arousal to circadian anticipatory behavior: ventromedial hypothalamus: one node in a hunger-arousal network. *Eur J Neurosci*. 30, 1730-1738.
- Rich, A., Leddon, S.A., Hess, S.L., Gibbons, S.J., Miller, S., Xu, X., et al., 2007. Kit-like immunoreactivity in the zebrafish gastrointestinal tract reveals putative ICC. *Dev Dyn*. 236, 903-911.
- Riley, L.G., Fox, B.K., Kaiya, H., Hirano, T., Grau, E.G., 2005. Long-term treatment of ghrelin stimulates feeding, fat deposition, and alters the GH/IGF-I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen Comp Endocrinol*. 142, 234-240.
- Rubio, V.C., Sanchez-Vazquez, F.J., Madrid, J.A., 2004. Oral administration of melatonin reduces food intake and modifies macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *J Pineal Res*. 37, 42-47.
- Rumessen, J.J., Thuneberg, L., 1996. Pacemaker cells in the gastrointestinal tract: interstitial cells of Cajal. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 216, 82-94.
- Saini, C., Liani, A., Curie, T., Gos, P., Kreppel, F., Emmenegger, Y., et al., 2013. Real-time recording of circadian liver gene expression in freely moving mice reveals the phase-setting behavior of hepatocyte clocks. *Genes Dev*. 27, 1526-1536.
- Saito, S., Tachibana, T., Choi, Y.H., Denbow, D.M., Furuse, M., 2005. ICV melatonin reduces acute stress responses in neonatal chicks. *Behav Brain Res*. 165, 197-203.
- Sakata, I., Sakai, T., 2010. Ghrelin cells in the gastrointestinal tract. *Int J Pept*. 2010.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., et al., 1998. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 92, 573-585.
- Sallinen, P., Saarela, S., Ilves, M., Vakkuri, O., Leppaluoto, J., 2005. The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sci*. 76, 1123-1134.
- Sanchez-Hidalgo, M., de la Lastra, C.A., Carrascosa-Salmoral, M.P., Naranjo, M.C., Gomez-Corvera, A., Caballero, B., et al., 2009. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol*. 44, 328-334.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Sanchez-Vazquez, F.J., Madrid, J.A., Zamora, S., 1995a. Circadian rhythms of feeding activity in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: dual phasing capacity of diel demand-feeding pattern. *J Biol Rhythms*. 10, 256-266.
- Sánchez-Vázquez, F.J., Madrid, J.A., Zamora, S., Tabata, M., 1997. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding-entrainable circadian oscillator. *Journal of Comparative Physiology A*. 181, 121-132.
- Sanchez-Vazquez, F.J., Yamamoto, T., Akiyama, T., Madrid, J.A., Tabata, M., 1998. Selection of macronutrients by goldfish operating self-feeders. *Physiol Behav*. 65, 211-218.
- Sanchez-Vazquez, F.J., Zamora, S., Madrid, J.A., 1995b. Light-dark and food restriction cycles in sea bass: effect of conflicting zeitgebers on demand-feeding rhythms. *Physiol Behav*. 58, 705-714.
- Sánchez, J.A., López-Olmeda, J.F., Blanco-Vives, B., Sánchez-Vázquez, F.J., 2009. Effects of feeding schedule on locomotor activity rhythms and stress response in sea bream. *Physiology & Behavior*. 98, 125-129.
- Sanchez, J.A., Madrid, J.A., Sanchez-Vazquez, F.J., 2010. Molecular cloning, tissue distribution, and daily rhythms of expression of *per1* gene in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Chronobiol Int*. 27, 19-33.
- Sánchez.Vázquez, F.J.y.M., J.A. , 2001 Feeding anticipatory activity. . En: Food intake in fish. Houlihan, D., Boujard, T., Jobling, M. (Eds.). Blackwell Science Ltd., Oxford. . 216-232.
- Sanders, K.M., 2008. Regulation of smooth muscle excitation and contraction. *Neurogastroenterol Motil*. 20 Suppl 1, 39-53.
- Sanders, K.M., Koh, S.D., Ward, S.M., 2006. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol*. 68, 307-343.
- Sato, T.K., Panda, S., Miraglia, L.J., Reyes, T.M., Rudic, R.D., McNamara, P., et al., 2004. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*. 43, 527-537.
- Sauzet, S., Besseau, L., Herrera Perez, P., Covès, D., Chatain, B., Peyric, E., et al., 2008. Cloning and retinal expression of melatonin receptors in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *General and Comparative Endocrinology*. 157, 186-195.
- Savaskan, E., Jockers, R., Ayoub, M., Angeloni, D., Fraschini, F., Flammer, J., et al., 2007. The MT2 melatonin receptor subtype is present in human retina and decreases in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 4, 47-51.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Scheving, L.A., 2000. Biological clocks and the digestive system. *Gastroenterology*. 119, 536-549.
- Scheving, L.A., Russell, W.E., 2007. It's about time: clock genes unveiled in the gut. *Gastroenterology*. 133, 1373-1376.
- Sebert, M.E., Legros, C., Weltzien, F.A., Malpaux, B., Chemineau, P., Dufour, S., 2008. Melatonin activates brain dopaminergic systems in the eel with an inhibitory impact on reproductive function. *J Neuroendocrinol*. 20, 917-929.
- Selbach, O., Haas, H.L., 2006. Hypocretins: The Timing of Sleep and Waking. *Chronobiology International*. 23, 63-70.
- Shahbazi, F., Holmgren, S., Larhammar, D., Jensen, J., 2002. Neuropeptide Y effects on vasorelaxation and intestinal contraction in the Atlantic cod *Gadus morhua*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 282, R1414-1421.
- Shibahara, M., Sakurai, T., Nambu, T., Takenouchi, T., Iwaasa, H., Egashira, S.-I., et al., 1999. Structure, tissue distribution, and pharmacological characterization of *Xenopus* orexins. *Peptides*. 20, 1169-1176.
- Shiia, T., Nakazato, M., Mizuta, M., Date, Y., Mondal, M.S., Tanaka, M., et al., 2002. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 87, 240-244.
- Shirasaka, T., Takasaki, M., Kannan, H., 2003. Cardiovascular effects of leptin and orexins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 284, R639-651.
- Silver, R., Balsam, P.D., Butler, M.P., LeSauter, J., 2011. Food anticipation depends on oscillators and memories in both body and brain. *Physiol Behav*. 104, 562-571.
- Singh, D., Rani, S., Kumar, V., 2013. Daily Expression of Six Clock Genes in Central and Peripheral Tissues of a Night-Migratory SongBird: Evidence for Tissue-Specific Circadian Timing. *Chronobiol Int*. 30, 1208-1217.
- Singletary, K.G., Deviche, P., Strand, C., Delville, Y., 2006. Distribution of orexin/hypocretin immunoreactivity in the brain of a male songbird, the house finch, *Carpodacus mexicanus*. *J Chem Neuroanat*. 32, 81-89.
- Sirotkin, A.V., Pavlova, S., Tena-Sempere, M., Grossmann, R., Jimenez, M.R., Rodriguez, J.M., et al., 2013. Food restriction, ghrelin, its antagonist and obestatin control expression of ghrelin and its receptor in chicken hypothalamus and ovary. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 164, 141-153.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Sladek, M., Rybova, M., Jindrakova, Z., Zemanova, Z., Polidarova, L., Mrnka, L., et al., 2007. Insight into the circadian clock within rat colonic epithelial cells. *Gastroenterology*. 133, 1240-1249.
- Smith, L.S., 1980 Digestion in teleost fishes. En: *Fish feed technologies* Ed. FAO/UNDP www.fao.org Cap. 1 pp 2-20.
- Smith, R., Leonard, R., Bailey, A.T., Palyha, O., Feighner, S., Tan, C., et al., 2001. Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands. *Endocrine*. 14, 9-14.
- Sosniyenko, S., Hut, R.A., Daan, S., Sumova, A., 2009. Influence of photoperiod duration and light-dark transitions on entrainment of Per1 and Per2 gene and protein expression in subdivisions of the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*. 30, 1802-1814.
- Stebelová, K., Anttila, K., Mänttari, S., Saarela, S., Zeman, M., 2010. Immunohistochemical definition of MT2 receptors and melatonin in the gastrointestinal tissues of rat. *Acta Histochemica*. 112, 26-33.
- Stefulj, J., Hortner, M., Ghosh, M., Schauenstein, K., Rinner, I., Wolfler, A., et al., 2001. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res*. 30, 243-247.
- Stengel, A., Goebel, M., Wang, L., Tache, Y., 2010. Ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 in gastric X/A-like cells: role as regulators of food intake and body weight. *Peptides*. 31, 357-369.
- Stephan, F.K., 2002. The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms*. 17, 284-292.
- Stock, D.W., 2007. Zebrafish dentition in comparative context. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 308B, 523-549.
- Stokkan, K.A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., 2001. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*. 291, 490-493.
- Sujino, M., Furukawa, K., Koinuma, S., Fujioka, A., Nagano, M., Iigo, M., et al., 2012. Differential entrainment of peripheral clocks in the rat by glucocorticoid and feeding. *Endocrinology*. 153, 2277-2286.
- Szurszewski, J.H., 1969. A migrating electric complex of canine small intestine. *Am J Physiol*. 217, 1757-1763.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Tahara, Y., Otsuka, M., Fuse, Y., Hirao, A., Shibata, S., 2011. Refeeding after Fasting Elicits Insulin-Dependent Regulation of Per2 and Rev-erb α with Shifts in the Liver Clock. *Journal of Biological Rhythms*. 26, 230-240.
- Tamai, T., Carr, A., Whitmore, D., 2005. Zebrafish circadian clocks: cells that see light. *Biochemical Society Transactions*. 33, 962-966.
- Tamai, T.K., Vardhanabhuti, V., Foulkes, N.S., Whitmore, D., 2004. Early embryonic light detection improves survival. *Current biology : CB*. 14, R104-R105.
- Tan, D.-X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Paredes, S.D., Korkmaz, A., Sainz, R.M., et al., 2010. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biological Reviews*. 85, 607-623.
- Teboul, M., Guillaumond, F., Grechez-Cassiau, A., Delaunay, F., 2008. The nuclear hormone receptor family round the clock. *Mol Endocrinol*. 22, 2573-2582.
- Tinoco, A.B., Naslund, J., Delgado, M.J., de Pedro, N., Johnsson, J.I., Jonsson, E., 2013. Ghrelin increases food intake, swimming activity and growth in juvenile brown trout (*Salmo trutta*). *Physiol Behav*. 124C, 15-22.
- Toshinai, K., Date, Y., Murakami, N., Shimada, M., Mondal, M.S., Shimbara, T., et al., 2003. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology*. 144, 1506-1512.
- Toshinai, K., Yamaguchi, H., Sun, Y., Smith, R.G., Yamanaka, A., Sakurai, T., et al., 2006. Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*. 147, 2306-2314.
- Tosini, G., Menaker, M., 1996. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science*. 272, 419-421.
- Tosini, G., Menaker, M., 1998. The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res*. 789, 221-228.
- Trivedi, P., Yu, H., MacNeil, D.J., Van der Ploeg, L.H., Guan, X.M., 1998. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett*. 438, 71-75.
- Uchiyama, T., Chess-Williams, R., 2004. Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. *J Smooth Muscle Res*. 40, 237-247.
- Unniappan, S., Canosa, L.F., Peter, R.E., 2004. Orexigenic actions of ghrelin in goldfish: feeding-induced changes in brain and gut mRNA expression and serum levels, and responses to central and peripheral injections. *Neuroendocrinology*. 79, 100-108.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Unniappan, S., Lin, X., Cervini, L., Rivier, J., Kaiya, H., Kangawa, K., et al., 2002. Ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake. *Endocrinology*. 143, 4143-4146.
- Unniappan, S., Peter, R.E., 2004. In vitro and in vivo effects of ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone release in goldfish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 286, R1093-1101.
- Vallone, D., Frigato, E., Vernesi, C., Foa, A., Foulkes, N.S., Bertolucci, C., 2007. Hypothermia modulates circadian clock gene expression in lizard peripheral tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292, R160-166.
- van der Lely, A.J., Tschöp, M., Heiman, M.L., Ghigo, E., 2004. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev*. 25, 426-457.
- van der Plasse, G., Merkestein, M., Luijendijk, M.C., van der Roest, M., Westenberg, H.G., Mulder, A.B., et al., 2013. Food cues and ghrelin recruit the same neuronal circuitry. *Int J Obes (Lond)*. 37, 1012-1019.
- Vanderwinden, J.M., 1999. Role of Interstitial Cells of Cajal and their relationship with the enteric nervous system. *Eur J Morphol*. 37, 250-256.
- Vantrappen, G., Janssens, J., Hellemans, J., Ghoo, Y., 1977. The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of the small intestine. *J Clin Invest*. 59, 1158-1166.
- Vatine, G., Vallone, D., Appelbaum, L., Mracek, P., Ben-Moshe, Z., Lahiri, K., et al., 2009. Light directs zebrafish *period2* expression via conserved D and E boxes. *PLoS Biol*. 7, e1000223.
- Vatine, G., Vallone, D., Gothilf, Y., Foulkes, N.S., 2011. It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett*. 585, 1485-1494.
- Velarde, E., Alonso-Gomez, A.L., Azpeleta, C., Isorna, E., De Pedro, N., Delgado, M.J., 2011a. Melatonin effects on gut motility are independent of the relaxation mediated by the nitrergic system in the goldfish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 159, 367-371.
- Velarde, E., Alonso-Gomez, A.L., Azpeleta, C., Isorna, E., Delgado, M.J., 2009a. Melatonin attenuates the acetylcholine-induced contraction in isolated intestine of a teleost fish. *J Comp Physiol B*. 179, 951-959.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Velarde, E., Cerda-Reverter, J.M., Alonso-Gomez, A.L., Sanchez, E., Isorna, E., Delgado, M.J., 2010a. Melatonin-synthesizing enzymes in pineal, retina, liver, and gut of the goldfish (*Carassius*): mRNA expression pattern and regulation of daily rhythms by lighting conditions. *Chronobiol Int.* 27, 1178-1201.
- Velarde, E., Delgado, M.J., Alonso-Gomez, A.L., 2010b. Serotonin-induced contraction in isolated intestine from a teleost fish (*Carassius auratus*): characterization and interactions with melatonin. *Neurogastroenterol Motil.* 22, e364-373.
- Velarde, E., Haque, R., Iuvone, P.M., Azpeleta, C., Alonso-Gomez, A.L., Delgado, M.J., 2009b. Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus*: cDNA cloning and rhythmic expression of period and cryptochrome transcripts in retina, liver, and gut. *J Biol Rhythms.* 24, 104-113.
- Velarde, E., Isorna, E., Delgado, M., 2011b. The molecular clock of goldfish retina: cloning and daily expression of *bmal1*, *npas2* and *clock*. En: *Avances en endocrinología comparada. Vol. VI.* Delgado, M.J., Alonso-Gómez, A.L., De Pedro, N., Isorna, E. (Eds.). Servicio de Publicaciones Universidad Complutense de Madrid. pp. 180-182.
- Vera, L.M., De Pedro, N., Gomez-Milan, E., Delgado, M.J., Sanchez-Muros, M.J., Madrid, J.A., et al., 2007. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiol Behav.* 90, 518-524.
- Vera, L.M., Negrini, P., Zagatti, C., Frigato, E., Sanchez-Vazquez, F.J., Bertolucci, C., 2013. Light and feeding entrainment of the molecular circadian clock in a marine teleost (*Sparus aurata*). *Chronobiol Int.* 30, 649-661.
- Vincent, J.P., Mazella, J., Kitabgi, P., 1999. Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 20, 302-309.
- Vivas, Y., Azpeleta, C., Feliciano, A., Velarde, E., Isorna, E., Delgado, M.J., et al., 2011. Time-dependent effects of leptin on food intake and locomotor activity in goldfish. *Peptides.* 32, 989-995.
- Volkoff, H., 2013. The effects of amphetamine injections on feeding behavior and the brain expression of orexin, CART, tyrosine hydroxylase (TH) and thyrotropin releasing hormone (TRH) in goldfish (*Carassius auratus*). *Fish Physiology and Biochemistry.* 39, 979-991.
- Volkoff, H., Bjorklund, J.M., Peter, R.E., 1999. Stimulation of feeding behavior and food consumption in the goldfish, *Carassius auratus*, by orexin-A and orexin-B. *Brain Res.* 846, 204-209.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Volkoff, H., Canosa, L.F., Unniappan, S., Cerda-Reverter, J.M., Bernier, N.J., Kelly, S.P., et al., 2005. Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen Comp Endocrinol.* 142, 3-19.
- Volkoff, H., Joy Eykelbosh, A., Ector Peter, R., 2003. Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting. *Brain Research.* 972, 90-109.
- Volkoff, H., Peter, R.E., 2001. Interactions between orexin A, NPY and galanin in the control of food intake of the goldfish, *Carassius auratus*. *Regul Pept.* 101, 59-72.
- Vuilleumier, R., Boeuf, G., Fuentes, M., Gehring, W.J., Falcon, J., 2007. Cloning and early expression pattern of two melatonin biosynthesis enzymes in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Eur J Neurosci.* 25, 3047-3057.
- Wall, A., Volkoff, H., 2013. Effects of fasting and feeding on the brain mRNA expressions of orexin, tyrosine hydroxylase (TH), PYY and CCK in the Mexican blind cavefish (*Astyanax fasciatus mexicanus*). *Gen Comp Endocrinol.* 183, 44-52.
- Wallace, K.N., Akhter, S., Smith, E.M., Lorent, K., Pack, M., 2005. Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mech Dev.* 122, 157-173.
- Wang, X., Zhao, T., Wei, H., Zhou, H., 2011. Regulation of dopamine D2 receptor expression in grass carp pituitary cells: a possible mechanism for dopaminergic modification of luteinizing hormone synthesis. *Gen Comp Endocrinol.* 173, 48-55.
- Watanabe, N., Itoh, K., Mogi, M., Fujinami, Y., Shimizu, D., Hashimoto, H., et al., 2012. Circadian pacemaker in the suprachiasmatic nuclei of teleost fish revealed by rhythmic period2 expression. *Gen Comp Endocrinol.* 178, 400-407.
- Wautier, K., Van der heyden, C., Huysseune, A., 2001. A quantitative analysis of pharyngeal tooth shape in the zebrafish (*Danio rerio*, Teleostei, Cyprinidae). *Arch Oral Biol.* 46, 67-75.
- Whitmore, D., Foulkes, N.S., Sassone-Corsi, P., 2000. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature.* 404, 87-91.
- Wingate, D., 1981. Backwards and forwards with the migrating complex. *Digestive Diseases and Sciences.* 26, 641-666.
- Withers, P.C., 1992. Comparative animal physiology. Saunders College Publishing. Orlando, Florida pp. 902-907.
- Wong, K.K., Ng, S.Y., Lee, L.T., Ng, H.K., Chow, B.K., 2011. Orexins and their receptors from fish to mammals: a comparative approach. *Gen Comp Endocrinol.* 171, 124-130.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Wood, J.D., Alpers, D.H., Andrews, P.L., 1999. Fundamentals of neurogastroenterology. Gut. 45 Suppl 2, II6-II16.
- Wright, M.L., Francisco, L.L., Scott, J.L., Richardson, S.E., Carr, J.A., King, A.B., et al., 2006. Effects of bilateral and unilateral ophthalmectomy on plasma melatonin in *Rana* tadpoles and froglets under various experimental conditions. Gen Comp Endocrinol. 147, 158-166.
- Xu, M., Volkoff, H., 2007. Molecular characterization of prepro-orexin in Atlantic cod (*Gadus morhua*): cloning, localization, developmental profile and role in food intake regulation. Mol Cell Endocrinol. 271, 28-37.
- Yahashi, S., Kang, K.S., Kaiya, H., Matsuda, K., 2012. GHRP-6 mimics ghrelin-induced stimulation of food intake and suppression of locomotor activity in goldfish. Peptides. 34, 324-328.
- Yamamoto, T., Nakahata, Y., Tanaka, M., Yoshida, M., Soma, H., Shinohara, K., et al., 2005. Acute physical stress elevates mouse period1 mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. J Biol Chem. 280, 42036-42043.
- Yamanaka, A., Beuckmann, C.T., Willie, J.T., Hara, J., Tsujino, N., Mieda, M., et al., 2003. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. Neuron. 38, 701-713.
- Yamanaka, A., Sakurai, T., Katsumoto, T., Yanagisawa, M., Goto, K., 1999. Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. Brain Res. 849, 248-252.
- Yan, A., Zhang, L., Tang, Z., Zhang, Y., Qin, C., Li, B., et al., 2011. Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) orexin: Molecular cloning, tissue expression, ontogeny, daily rhythm and regulation of NPY gene expression. Peptides. 32, 1363-1370.
- Yang, J., Brown, M.S., Liang, G., Grishin, N.V., Goldstein, J.L., 2008. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. Cell. 132, 387-396.
- Yannielli, P.C., Molyneux, P.C., Harrington, M.E., Golombek, D.A., 2007. Ghrelin effects on the circadian system of mice. J Neurosci. 27, 2890-2895.
- Yeung, C.M., Chan, C.B., Woo, N.Y., Cheng, C.H., 2006. Seabream ghrelin: cDNA cloning, genomic organization and promoter studies. J Endocrinol. 189, 365-379.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Yi, C.X., Challet, E., Pevet, P., Kalsbeek, A., Escobar, C., Buijs, R.M., 2008. A circulating ghrelin mimetic attenuates light-induced phase delay of mice and light-induced Fos expression in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Eur J Neurosci.* 27, 1965-1972.
- Yin, X., Li, Y., Xu, G., An, W., Zhang, W., 2009. Ghrelin fluctuation, what determines its production? *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 41, 188-197.
- Yokogawa, T., Marin, W., Faraco, J., Pézéron, G., Appelbaum, L., Zhang, J., et al., 2007. Characterization of Sleep in Zebrafish and Insomnia in Hypocretin Receptor Mutants. *PLoS Biol.* 5, e277.
- Yoshida, Y., Fujiki, N., Nakajima, T., Ripley, B., Matsumura, H., Yoneda, H., et al., 2001. Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur J Neurosci.* 14, 1075-1081.
- Zawilska, J.B., Lorenc, A., Berezinska, M., Vivien-Roels, B., Pevet, P., Skene, D.J., 2006. Diurnal and circadian rhythms in melatonin synthesis in the turkey pineal gland and retina. *Gen Comp Endocrinol.* 145, 162-168.
- Zhang, S., Blache, D., Vercoe, P.E., Adam, C.L., Blackberry, M.A., Findlay, P.A., et al., 2005. Expression of orexin receptors in the brain and peripheral tissues of the male sheep. *Regul Pept.* 124, 81-87.
- Zhang, X., Guo, H., Xu, J., Li, Y., Li, L., Zhang, X., et al., 2012. Dopamine receptor D1 mediates the inhibition of dopamine on the distal colonic motility. *Transl Res.* 159, 407-414.
- Zhang, Y., Liu, Y., Huang, X., Liu, X., Jiao, B., Meng, Z., et al., 2008. Two alternatively spliced GPR39 transcripts in seabream: molecular cloning, genomic organization, and regulation of gene expression by metabolic signals. *J Endocrinol.* 199, 457-470.
- Zhdanova I, Reeb SG, 2006. Circadian rhythms in fish. In: Sloman KA, Wilson RW, Balshine S eds. *Fish Physiology, Vol 24: Behaviour and Physiology of Fishes.* New York: Elsevier. 197-238.
- Zilberman-Peled, B., Benhar, I., Coon, S.L., Ron, B., Gothilf, Y., 2004. Duality of serotonin-N-acetyltransferase in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): molecular cloning and characterization of recombinant enzymes. *Gen Comp Endocrinol.* 138, 139-147.
- Zilberman-Peled, B., Bransburg-Zabary, S., Klein, D.C., Gothilf, Y., 2011. Molecular evolution of multiple arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) in fish. *Mar Drugs.* 9, 906-921.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Zilberman-Peled, B., Ron, B., Gross, A., Finberg, J.P., Gothilf, Y., 2006. A possible new role for fish retinal serotonin-N-acetyltransferase-1 (AANAT1): Dopamine metabolism. *Brain Res.* 1073-1074, 220-228.
- Zizzo, M.G., Mule, F., Mastropaolo, M., Serio, R., 2010. D1 receptors play a major role in the dopamine modulation of mouse ileum contractility. *Pharmacol Res.* 61, 371-378.
- Zvonic, S., Ptitsyn, A.A., Conrad, S.A., Scott, L.K., Floyd, Z.E., Kilroy, G., et al., 2006. Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes.* 55, 962-970.